

Année 1963

THÈSE

N° 438
N° 438

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

DIPLOME D'UNIVERSITÉ

par

Jan BELEHRADEK

né le 14 Mai 1932 à BRNO (Tchécoslovaquie)

Présentée et soutenue publiquement le 17 Mai 1963

TUMEURS HUMAINES EN CULTURE "IN VITRO".
APPLICATIONS EXPERIMENTALES ET PARACLINIQUES.

INSTITUT GUSTAVE-ROUSSY - VILLEJUIF (Seine)

Président : Mr Jean BERNARD, Professeur

Année 1963

THÈSE

N°

N°

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

DIPLOME D'UNIVERSITÉ

par

Jan BELEHRADEK

né le 14 Mai 1932 à BRNO (Tchécoslovaquie)

Présentée et soutenue publiquement le 17 Mai 1963

TUMEURS HUMAINES EN CULTURE "IN VITRO"
APPLICATIONS EXPERIMENTALES ET PARACLINIQUES.

INSTITUT GUSTAVE-ROUSSY - VILLEJUIF (Seine)

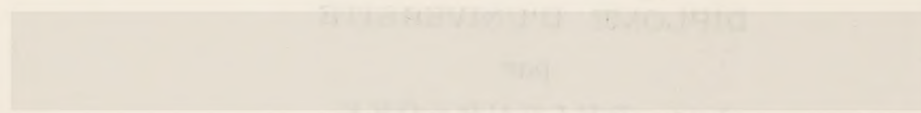
Président : Mr Jean BERNARD, Professeur

THÈSE

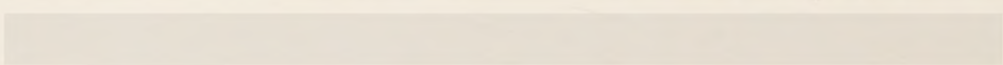
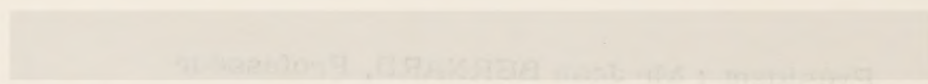
Année 1905

Pour le

DOCTORAT EN MÉDECINE



Digitized by the Internet Archive
in 2026



PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. Alajouanine (T.), Aubin (A.), Bénard (H.), Bulliard (H.), Cadenat (F.), Chabrol (E.), Debré (R.), Fey (B.), Galliard (H.), Gastinel (P.), Halphen (E.), Hazard (R.), Heuyer (G.), Lantuejoul (P.), Laroche (G.), Lavier (G.), Lévy-Solal (E.), Lian (C.), Mathieu (P.), Mocquot (P.), Monod (R.), Moreau (R.), Moulouquet (P.), Mouquin (M.), Olivier (E.), Pasteur Valléry-Radot, Petit-Dutaillis (D.), Piédelièvre (R.), Quénu (J.), Richet (C.), Senèque (J.), Strohl (A.), Tanon (L.), Verne (J.).

DOYEN Léon BINET.
Membre de l'Institut

1^{er} ASSESSEUR } Gaston CORDIER
2^e ASSESSEUR } Paul CASTAIGNE

I. — PROFESSEURS

1^o CHAIRES DE SCIENCES FONDAMENTALES

a) Professeurs titulaires :

	MM.
Anatomie	DELMAS (A.)
Anatomie pathologique	DELARUE (J.)
Anesthésiologie	BAUMANN (J.)
Biochimie médicale	{ JAYLE (M.-F.) SCHAPIRA (G.)
Biologie appliquée à l'Education physique et aux Sports	CHAILLEY-BERT (P.)
Biologie médicale	FAUVERT (R.)
Cancérologie médicale et sociale	BERNARD (J.)
Embryologie	TUCHMANN (H.)
Histoire de la médecine et de la chirurgie (Lariboisière)	JOANNON (P.)
Histologie	GIROUD (A.)
Hygiène et médecine préventive	BOYER (J.)
Médecine du Travail	DESOILLE (H.)
Médecine légale	DEROBERT (L.)
Microbiologie (Bactériologie et virologie)	FASQUELLE (R.)
Parasitologie	BRUMPT (L.-G.)
Pathologie chirurgicale	LAURENCE (G.)
Pathologie exotique	N...
Pathologie expérimentale et comparée	MERKLEN (F.-P.)
Pathologie médicale	N...
Pathologie respiratoire	TURIAF (J.)
Pathologie et thérapeutique générales	BOUDIN (G.)
Pharmacologie	CHEYMOL (J.)
Physiologie	{ BINET (L.) BARGETON (D.)
Physiologie et pathologie obstétricale	LEPAGE (F.)
Physique médicale	{ DOGNON (A.) DJOURNO (A.)
Radiologie médicale	DESGREZ (H.)
Technique chirurgicale et Chirurgie expérimentale	CAUCHOIX (J.)
Thérapeutique	CONTE (M.)
Thérapeutique appliquée	LAMOTTE (M.)

b) Professeurs à titre personnel :

Biochimie médicale	{ DESGREZ (P.) POLONOVSKI (J.)
Biologie médicale	BOURLIÈRE (F.)
Hygiène et médecine préventive	DEPARIS (M.)
Pharmacologie	LÉVY (M ^{lle} J.)
Physiologie	PARROT (J.)
Physique médicale	KELLERSNOHN (L.)

2° CHAIRES DE SCIENCES CLINIQUES

a) Professeurs titulaires :

	MM.
Clinique carcinologique chirurgicale (Necker)	REDON (H.)
Clinique cardiologique (Broussais)	SOULIÉ (P.)
Cliniques chirurgicales	Beaujon LORTAT-JACOB (J.-L.)
	Cochin LEGER (L.)
	Cochin ABOULKER (P.)
	Hôtel-Dieu PATEL (J.)
	Pitié CORDIER (G.)
	Saint-Antoine GOSSET (J.)
	Salpêtrière SICARD (A.)
	Tenon OLIVIER (Cl.)
Clinique de chirurgie infantile et orthopédique (Enfants-Malades)	FÈVRE (M.)
Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique (Cochin)	MERLE D'AUBIGNÉ (R.)
Clinique de chirurgie cardio-vasculaire (Broussais)	GAUDART D'ALLAINES (F. de)
Clinique de chirurgie pleuro-pulmonaire (Laennec)	MATHEY (J.)
Clinique endocrinologique (Pitié)	DECOURT (J.)
Clinique de Génétique médicale (Enfants-Malades)	LAMY (M.)
Clinique gynécologique (Broca)	HUGUIER (J.)
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques (Saint-Louis)	DEGOS (R.)
Clinique des maladies des Enfants (Enfants-Malades)	CATHALA (J.)
Clinique des maladies infectieuses (Claude-Bernard)	MOLLARET (P.)
Clinique des maladies mentales et de l'encéphale (Sainte-Anne)	DELAY (J.)
Clinique des maladies métaboliques (Necker)	HAMBURGER (J.)
Clinique des maladies du sang (Broussais)	MARCHAL (G.)
Clinique des maladies du système nerveux (Salpêtrière)	CASTAIGNE (P.)
Cliniques médicales	Boucicaut MILLIEZ (P.)
	Broussais LENÈGRE (J.)
	Cochin JUSTIN-BESANÇON (L.)
	Cochin BROUET (G.)
	Hôtel-Dieu BARIÉTY (M.)
	Lariboisière SÈZE (S. de)
	Pitié DREYFUS (G.)
	Saint-Antoine KOURILSKY (R.)
Clinique d'hydrologie et de climatologie (Bichat)	DEBRAY (G.)
Clinique médicale propédeutique (Broussais)	GENNES (L. de)
Clinique médico-sociale du diabète sucré et des maladies de la nutrition (Hôtel-Dieu)	
Clinique de neuro-chirurgie (Pitié)	DEROT (M.)
Clinique neurologique (Salpêtrière)	DAVID (M.)
Cliniques obstétricales	GARCIN (R.)
	Baudelocque LACOMME (M.)
	Foch (Suresnes) MERGER (R.)
Clinique obstétricale et gynécologique (Port-Royal)	VARANGOT (J.)
Clinique ophtalmologique (Hôtel-Dieu)	RENARD (G.)
Clinique oto-rhino-laryngologique (Lariboisière)	AUBRY (M.)
Clinique de pédiatrie et de puériculture (Saint-Vincent-de-Paul)	LELONG (M.)
Clinique de pédiatrie sociale (Enfants-Malades)	MARIE (J.)
Clinique de pneumo-phtisiologie (Laennec)	BERNARD (E.)
Clinique de neuro-psychiatrie infantile (Salpêtrière)	MICHAUX (L.)
Clinique de rhumatologie médicale et sociale (Cochin)	COSTE (F.)
Clinique stomatologique (Pitié)	DECHAUME (M.)
Clinique thérapeutique chirurgicale (Vaugirard)	ROUX (M.)
Clinique thérapeutique médicale (Saint-Antoine)	LEMAIRE (A.)
Clinique toxicologique	GAULTIER (M.)
Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique	PADOVANI (P.)
Sémiologie médicale	DOMART (A.)
Sémiologie et clinique chirurgicales	POILLEUX (F.)
Clinique urologique (Necker)	COUVELAIRE (R.)
Hygiène et clinique de la première enfance (Trousseau)	TURPIN (R.)

b) Professeurs à titre personnel :

Médecine	(BOUR (H.) LHERMITTE (F.) PEQUIGNOT (H.)
--------------------	---

II. — PROFESSEURS SANS CHAIRE, PROFESSEURS AGRÉGÉS ET MAÎTRES DE CONFÉRENCES - AGRÉGÉS

	MM.
Anatomie	CABROL (C.)
	COUINAUD (C.)
	GILLOT (C.)
	OLIVIER (G.) pr. s. ch.
Anatomie pathologique	GAUTHIER-VILLARS (Mlle P.) pr. s. ch.
	ABELANET (R.)
	CHOMETTE (G.)
	GOUYGOU (Ch.), m. conf.
	NEZELOFF (Ch.)
	ORCEL (L.)
Anesthésiologie	PAILLAS (J.)
	KERN (E.)
	VOURC'H (G.)
Bactériologie	BARBIER (P.) pr. s. ch.
	CHRISTOL (D.)
	LE MINOR (L.)
	TOURNIER (P.)
	RAGLIER Et. m. conf.
Biochimie médicale	BOURILLON (R.)
	CARTIER (P.)
	DREYFUS (J.-Cl.)
	GONNARD (P.)
	KRUH (J.)
	JEROME (H.)
Biologie appliquée à l'Éducation Physique et aux Sports	PLAS (F.)
	BOIRON (M.)
Garcinologie	DENOIX (P.)
	MATHE (G.)
	SELIGMANN (M.)
	CIVATTE (J.)
Dermato-Syphiligraphie	DUPERRAT (B.)
Electro-Radiologie	LEDoux-LEBARD (G.)
	BESSIS (M.)
	BILSKI-PASQUIER (G.)
Hématologie	DAUSSET (J.)
	DUHAMEL (G.)
	COUJARD (R.), pr. s. ch.
Histologie	MARois (M.)
	RACADOT (J.)
	BESANÇON (F.)
Hydrologie	CORNET (A.)
	BOYER (J.) pr. s. ch.
Hygiène	BLANCHER (G.)
	CORRE-HURST (Mme L.)
	SAPIN-JALOUSTRE (H.)
	BASTIN (R.) Pr. s. ch.
Maladies infectieuses	DUPONT (V.)
Médecine légale	FOURNIER (E.)
	GUENIOT (M.)
	HADENGUE (A.)
Médecine du travail	ALBAHARY (C.)
Neuro-chirurgie	PERTUISET (S.)
Neurologie	LAPRESLE (J.)
	GRANJON (A.)
	HERVET (E.)
	LE LORIER (G.)
	LEVY (J.)
	MORIN (P.)
	MUSSET (R.)
	ROBEY (M.)
	SENEZE (J.)
	SUREAU (C.)
Obstétrique	THOYER-ROZAT (J.)
	BRÉGEAT (P.)
	DUBOIS (A.)
Ophtalmologie	SARAUX (H.)

	MM.
Orthopédie	JUDET (R.)
	MEARY (R.)
	POSTEL (M.)
	RAMADIER (J.)
Oto-rhino-Laryngologie	DEBAIN (J.)
	PIALOUX (P.)
Parasitologie	GOLVAN (Y.)
	LAPIERRE (J.)
Pathologie chirurgicale	BARCAT (J.)
	BINET (J.-P.)
	GERBONNET (G.)
	CHATELIN (C.-L.)
	DUBOST (Ch.)
	DUBOST (Cl.)
	FAUREL (J.)
	FLABEAU (F.)
	GARBAY (M.)
	GARNIER (H.)
	(Cl. de) GAUDART-d'ALLAINES
	GERMAIN (A.)
	LATASTE (J.)
	LOYGUE (J.)
	MERCADIER (M.)
	NATALI (J.)
	PELLERIN (D.)
Pathologie exotique	PERROTIN (J.)
	ROBERT (H.)
	THOMERET (G.)
	SCHNEIDER (J.)
Pathologie expérimentale	BENHAMOU (J.-P.)
	BERTHAUX (P.)
	BOIVIN (P.)
	CROSNIER (J.)
	HARTMANN (L.)
	LÉPER (J.) Pr. s. ch.
	MAURICE (J.)
	MIKOL (Cl.)
	RICHET (G.)
	AUSANNIAIRE (M.)
Pathologie médicale	BOUVIER (J.)
	BOUVRAIN (Y.)
	BRICAIRE (H.)
	BRISAUD (H.)
	BROCARD (H.)
	BUGE (A.)
	CATINAT (J.)
	CHRÉTIEN (J.)
	GOBLENTZ (B.)
	CONTAMIN (F.)
	COURY (C.)
	ÉTIENNE (J.-P.)
	FREZAL (J.)
	FRITEL (D.)
	HENNEQUET (A.)
	HIMBERT (J.)
	HOUSSET (E.)
Pédiatrie-Puériculture	LAROCHE (Cl.)
	LESOBRE (R.)
	LEVEQUE (B.)
	MACREL (G.)
	MOEYAU (L.)
	NICK (J.)
	ROYER (P.)
	TOURNEUR (R.)
	WOLFROMM (R.)
	LAFOURCADE (J.)
	LEPERCQ (G.)
	MANDE (R.)
	MOZZICONACCI (P.)
	POLONOVSKI (C.)
	ROSSIER (A.)
	VIALATTE (J.)

	MM.
Pharmacologie	BOISSIER (J.) LECHAT (P.) BARRES (G.) DEJOURS (P.) pr. s. ch.
Physiologie	DURAND (J.) GIRARD m. conf. HUGELIN (A.) SCHERRER (J.) CHANTEUR (J.) COUGEROT (L.), m. conf. pr. s. ch.
Physique médicale	GREMY (F.) m. conf. MILHAUD (G.) PELLERIN (P.) ROUCAYROL (J.-Cl) TUBIANA (M.) m. conf.
Pneumo phtisiologie.	KREIS (B.) MEYER (A.) RENAULT (P.)

	MM.
Psychiatrie	PICHOT (P.)
Psychiatrie infantile.	DENIKER (P.) DUCHE (D.) FLAVIGNY (H.)
Rhumatologie	DELBARRE (F.) pr. s. ch.
Stomatologie.	CERNEA (P.) CHAPUT (M ^{me} A.) m. c. agr. GRELLET (M.)
Thérapeutique	CHASSAGNE (P.) MARCHE (J.)
Urologie.	AUVERT (J.) MOULONGUET (A.) QUENU (L.)

III. — PROFESSEURS SANS CHAIRE ET AGRÉGÉS CHARGÉS DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE à titre permanent.

	MM.
Anatomie	DEBEYRE (J.)
Clinique chirurgicale	VERNE (J.-M.)
Clinique médicale.	PERRAULT (M.) RAMBERT (P.) THIEFFRY (S.)
Clinique obstétricale	GRASSET (J.) MAYER (M.)

	MM.
Clinique ophtalmologique	DESVIGNES (P.) OFFRET (G.)
Clinique pédiatrique et pué- riculture	LAPLANE (R.)
Clinique psychiatrique.	BARUK (H.)
Clinique urologique	KUSS (R.)

IV. — PROFESSEURS DÉTACHÉS DANS LES UNIVERSITÉS ÉTRANGÈRES

Bactériologie.	HAUDUROY (P.) Pr. s. ch.
Pathologie chirurgicale	RUDLER (J.) Pr. s. ch.

V. — CHARGÉS DE COURS D'HYGIÈNE SCOLAIRE ET UNIVERSITAIRE

Secrétaire général de la Faculté	M. LENA (J.)
Secrétaire principal.	Mlle CHAINTREUIL (G.)
Conservateur en Chef de la Bibliothèque	M. le Docteur HAHN (A.)
Conservateur du Musée d'Histoire de la Médecine	
Conservateurs	Mlles DUMAITRE (P.), LE NOIR (G.), QUIÉVREUX (E.)
Bibl'othécaire	Mmes CONTET (J.), FORGET (F.), Mlle LAURENT (H.)

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A Monsieur le Professeur Jean BERNARD

Professeur de la Chaire de Cancérologie Médicale et Sociale
à la Faculté de Médecine de Paris

Qui nous a fait le très grand honneur d'accepter
la Présidence de cette Thèse

En témoignage de notre profond respect.

A Monsieur le Professeur Pierre F. DENOIX

Professeur Agrégé de Carcinologie à la Faculté de
Médecine de Paris

Directeur de l'Institut Gustave Roussy

Qu'il nous soit permis de le remercier pour
l'accueil toujours bienveillant qu'il a bien
voulu nous réserver.

En témoignage de notre profonde reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Georges BARSKI

Maître de Recherches au C.N.R.S.

Chef du Laboratoire de Culture de Tissus et de Virologie
à l'Institut Gustave Roussy

Qui nous a accueilli dans son Laboratoire, guidé
nos premiers pas dans la recherche et inspiré
le sujet de cette thèse.

Qu'il trouve ici l'expression de notre affectueuse
reconnaissance pour l'aide constante qu'il a bien
v oulu nous apporter et pour l'enseignement que
nous avons reçu de lui.

MLIS
et
AMICIS

TUMEURS HUMAINES EN CULTURE "IN VITRO"
Applications expérimentales et paracliniques

INTRODUCTION

Chap. I

HISTORIQUE

Chap. II.

APERÇUS SUR LES TECHNIQUES DE LA CULTURE "IN VITRO"

- A. Traitement des tissus à explanter.
- B. Supports de culture.
- C. Récipients de culture.
- D. Milieux nutritifs.
- E. Conditions physiques de culture.

Chap. III.

TECHNIQUES D'OBSERVATION

Chap. IV.

VALEUR EXPERIMENTALE DES CULTURES DE TUMEURS HUMAINES
"IN VITRO".

- A. Morphologie cellulaire.
- B. Adaptation à la vie "in vitro".
- C. Différentiation et dédifférentiation.
- D. Transformation et cancérisation des cellules
"in vitro".
- E. Invasion cancéreuse des tissus normaux "in vitro".
- F. Recherches immunologiques.
- G. Recherches radiobiologiques.
- H. Recherches biochimiques.
- I. Recherches pharmacologiques.

Chap. V.

APPLICATIONS PARA-CLINIQUES POSSIBLES DES CULTURES
DE TUMEURS HUMAINES. PERSPECTIVES.

- A. Culture de tissus comme moyen auxiliaire du
diagnostic histo-pathologique.
- B. Les essais d'activité des composés chimio-thé-
rapeutiques sur cultures de tumeurs humaines
individuelles.

CONCLUSIONS

BIBLIOGRAPHIE

I N T R O D U C T I O N

La culture de tissus dans sa forme moderne représente certainement une des méthodes d'étude les plus fécondes en biologie expérimentale. En maintenant les cellules de Métazoaires à l'état vivant en dehors de l'organisme, facilement accessibles aux observations continues, l'expérimentateur dispose d'un moyen applicable aux études les plus diverses. Sans prétendre que les observations réalisées sur les cultures "in vitro" aient toujours strictement la même signification que celles effectuées "in vitro", nous pouvons affirmer que la culture de tissus est une méthode de choix pour les recherches des effets directs des facteurs chimiques, physiques ou biologiques au niveau cellulaire.

Dans le domaine de la cancérologie expérimentale, la culture de tissus permet d'aborder les problèmes des particularités intrinsèques de la cellule soustraite aux systèmes de régulation de l'organisme. L'obtention des souches et des clones cellulaires malins ou non, stabilisés et bien définis, offre un matériel standardisé dont nous pouvons explorer les réactions et les modifications dans des conditions expérimentales diverses strictement déterminées et contrôlables.

Pour l'exploration des phénomènes qui se déroulent dans la cellule maligne d'origine humaine, la culture "in vitro" nous semble être une méthode particulièrement précieuse parce que permettant des recherches irréalisables "in vivo" pour des raisons évidentes. Elle constitue ainsi un lien entre l'expérimentation sur animaux et l'expérimentation clinique, facilitant les extrapolations et les applications à la pathologie humaine des résultats obtenus sur animaux de laboratoire. De plus, certaines applications de la culture de tumeurs humaines peuvent être directement exploitées comme moyens auxiliaires pour les investigations paracliniques concernant des malades individuels.

C'est la raison principale pour laquelle la culture "in vitro" de tumeurs humaines a retenu notre attention, ceci d'autant plus que la bibliographie moderne en langue française concernant ce sujet n'est que peu fournie.

Nous nous proposons, par conséquent, de présenter, dans leurs grandes lignes, les notions essentielles acquises grâce à ce procédé: nous examinerons successivement ses aspects techniques, ses possibilités expérimentales et ses applications para-cliniques.

Cependant, n'oublions pas que la cancérologie expérimentale humaine n'est qu'une partie de l'ensemble de la cancérologie expérimentale générale. Ceci nous amènera à faire parfois incursion dans le domaine des expériences effectuées sur les tissus animaux; nous espérons ainsi mieux dégager certains caractères communs aux cellules malignes, indépendamment de leur espèce d'origine.

Chapitre I

HISTORIQUE

Le large éventail des méthodes et des possibilités de la culture de tissus telle que nous la pratiquons actuellement, représente l'aboutissement d'une longue série de recherches.

Les premières tentatives de maintien de fragments de tissus vivants en dehors de l'organisme ont été rapportées par des embryologistes; ainsi Wilhelm ROUX en 1884 (140), ayant placé la partie centrale de l'embryon de poulet dans une solution tiède de NaCl, a pu saisir les étapes de la formation du tube neural et du tube intestinal. D'autres travaux de ROUX et ceux de BORN, entrepris à cette même époque sur les fragments d'embryons de Batraciens, ont permis de conclure que les cellules en dehors de l'organisme peuvent conserver, pendant un certain temps, leur vitalité et leur capacité de division. Notons, cependant, qu'il s'agissait là de cellules bien particulières à potentiel d'évolution élevé.

Quelques années plus tard, en 1887, ARNOLD (5) étudie l'activité migratrice des leucocytes de grenouille maintenus dans une solution saline ou dans l'humour aqueuse. En 1901, Léo LOEB (96) publie les résultats de ses expériences au cours desquelles il a constaté que les fragments de tissus adultes ou embryonnaires des mammifères, inclus dans un caillot de fibrine ou dans la gélose et placés sous la peau du cobaye, restent vivants et prolifèrent. Parmi les autres travaux précurseurs de la culture de tissus, citons les observations de HIRSCHFELD et DEETJEN (cités par CRACIUN, 45) qui ont souligné, en 1901, l'importance de la neutralité chimique des milieux utilisés pour maintenir les cellules, en l'occurrence les lymphocytes, en vie hors de l'organisme. Toujours dans le domaine de l'hématologie, JOLLY en 1903 (78) observait "in vitro" pendant plusieurs semaines les cellules sanguines de Triton et leurs mitoses.

De toutes ces recherches sur le maintien des cellules vivantes en dehors de l'organisme, plusieurs principes de base se sont dégagés: la nécessité de l'asepsie, celle de la température optimale des préparations, l'importance de la

neutralité chimique, l'influence de la composition du milieu qui doit fournir aux cellules "in vitro" un environnement aussi proche que possible des conditions existant "in vivo".

C'est à partir de 1907 que, en s'inspirant de ces notions, HARRISON, BURROWS et CARREL, ont établi les bases de la culture de tissus proprement dite, et transformé cette technique, au départ rudimentaire, en une méthode expérimentale de choix.

HARRISON (70) ayant excisé un fragment de la gouttière médullaire d'un embryon de grenouille, l'a suspendu dans une goutte de lymphe coagulée sur une lamelle de verre et placé le tout en coiffant une lame de verre creuse. Grâce à ce dispositif, il a pu suivre sous le microscope la genèse des fibres nerveuses, la croissance et la différenciation des cellules émigrées du fragment vers le coagulum, et faire la démonstration directe de l'origine de la fibre nerveuse.

Reprenant la technique de HARRISON, BURROWS (29) l'a utilisée d'abord pour les cultures "in vitro" des tissus embryonnaires du poulet en y apportant une amélioration notable, à savoir, l'emploi du plasma sanguin homologue comme milieu de culture. Par la suite, BURROWS et Alexis CARREL, prouvant que la méthode de culture de tissus peut avoir une application générale, ont cultivé "in vitro" les tissus des origines les plus diverses.

Comme le souligne R.C. PARKER (119) dans son récent ouvrage sur les méthodes de la culture de tissus, l'apport d'Alexis CARREL à ces techniques est capital. C'est CARREL qui a introduit l'utilisation dans les cultures de l'extrait embryonnaire dont la présence, associée à celle du plasma, stimule la croissance (32). Les perfectionnements techniques, l'expérimentation sur les exigences nutritives et la méthode de repiquage des cultures ont permis à CARREL d'établir une souche de fibroblastes d'embryon de poulet qui s'est propagée activement "in vitro" pendant 34 ans.

C'est encore CARREL qui, avec BURROWS, a inauguré le domaine de la culture des diverses tumeurs et, en particulier, celui de la culture des tumeurs humaines qui nous intéresse ici, (30, 36). CARREL ainsi réussit à maintenir un sarcome "in vitro" pendant deux mois. Il a établi que les tissus malins, comme

d'ailleurs également les tissus normaux, prennent "in vitro", selon leur origine, soit l'aspect conjonctif, soit l'aspect épithélial, et que le pouvoir cancéreux des cellules malignes se maintient au cours de passages "in vitro" (34).

D'autres noms restent attachés à l'époque héroïque de la culture tissulaire. Citons au moins les LEWIS (94) qui ont, les premiers, étudié des milieux artificiels chimiquement définis, MAXIMOW (100) à qui nous devons la méthode de double lamelle et C. CHAMPY (39) qui a abordé, entre autres, les problèmes de la différenciation cellulaire "in vitro".

Parmi les chercheurs qui se sont, après CARREL et BURROWS, intéressés à la culture "in vitro" des tumeurs humaines, nous trouvons LOSLI et EBELING qui ont cultivé, en 1913, un sarcome humain pendant 52 jours (97), MACCABRUNI (98) qui, la même année, a réussi, bien que temporairement, à observer "in vitro" un carcinome utérin humain, KIAER et FISCHER (cités par CRACIUN, 45) qui ont rapporté l'observation d'un gliosarcome humain maintenu en culture tissulaire pendant deux mois.

Devenue, à partir de 1920 environ, une technique mieux codifiée, la culture de tissus "in vitro" n'a pas cessé de se perfectionner. L'introduction de la trypsination pour la préparation des cultures des cellules dispersées, suggérée par ROUS et JONES (139) et adoptée comme procédé courant par YOUNGNER (156), l'emploi de récipients simplifiant le renouvellement du milieu (CARREL, 33), l'obtention de souches cellulaires à partir de tissus normaux ou cancéreux (SANFORD, EARLE et LIKELY, 141), l'utilisation de techniques d'observation telles que la microscopie au contraste de phase et la microcinématographie au ralenti permettant de saisir les aspects dynamiques des cultures, voici, à titre d'exemples, quelques bornes de cette évolution.

Pourtant, les difficultés liées à la nécessité d'une asepsie rigoureuse des cultures compliquaient encore longtemps la tâche des expérimentateurs et limitaient souvent la portée de cette technique. Cependant, avec l'introduction des antibiotiques, ce problème a perdu beaucoup de son acuité et la culture de tissus a reçu, alors, une puissante impulsion ouvrant les possibilités de pratiquer des cultures massives, en grandes séries et de longue durée, et permettant des observations prolongées et approfondies.

Chapitre II

APERÇUS SUR LES TECHNIQUES DE LA CULTURE "IN VITRO"

Pour la mise en culture et pour le maintien des cellules vivantes "in vitro", différentes techniques peuvent être utilisées, chacune adaptée aux exigences particulières de l'étude envisagée. Le traitement de l'échantillon de tissu avant l'explantation, la nature du support de la culture et le type de récipient utilisé ne seront pas toujours les mêmes, mais devront, cependant, répondre à la nécessité de respecter un certain nombre de principes fondamentaux: protection des cultures contre l'infection accidentelle bactérienne, virale ou fongique, maintien du pH et de la température dans les limites physiologiques, caractère isotonique du milieu, absence de substances toxiques.

A. TRAITEMENT DES TISSUS A EXPLANTER

Après l'excision chirurgicale de l'échantillon destiné à la culture "in vitro", le prélèvement, acheminé rapidement au laboratoire dans un récipient stérile à l'abri de la dessiccation et de la contamination, est traité sans délai en vue de sa mise en culture. Deux procédés différents peuvent alors être utilisés: le tissu peut être explanté soit sous la forme de petits fragments, soit sous la forme d'une suspension de cellules libérées de la trame tissulaire.

a) Découpage en fragments

Ce procédé a été utilisé déjà par CARROLL et BURROWS (35). Le tissu, découpé d'abord en tranches, est abondamment lavé à l'aide d'une solution saline équilibrée afin d'éliminer les débris tissulaires et les caillots de sang. Avec un bistouri ophtalmologique ou avec une paire de lames de rasoir fixées sur des porte-lames spéciaux (cf. PARKER, 119), on découpe le tissu en fragments de 1 mm^3 approximativement, aussi réguliers que possible, et on les rince soigneusement. Suspendus dans le milieu nutritif, éventuellement additionné d'extrait embryonnaire, ils sont prêts à être inclus dans le coagulum plasmatique.

b) Préparation des suspensions cellulaires.

Il est possible d'établir les cultures en se servant des suspensions contenant des cellules libérées de la trame tissulaire. La trypsine diluée était utilisée dans ce but dès 1916 par ROUS et JONES (139); plus près de nous, DULBECCO (46) et YOUNGLER (156) ont repris et standardisé cette technique de trypsination pour l'établissement des cultures en couches monocellulaires. ANDERSON (4) dissocie le tissu à explanter en suspension cellulaire à l'aide de certains agents chélateurs comme le versène (acide éthylène-diamino-tétracétique), dilués dans une solution saline équilibrée exempte de Ca et de Mg. LASFARGUS (83) ainsi que HINZ et SYLRTON (71) préconisent, dans ce même but, l'emploi de collagénase. Enfin, LASFARGUS (84) a décrit une technique de dissociation des biopsies des carcinomes mammaires par dilacération mécanique.

B. SUPPORTS DE CULTURE.

Le support habituellement utilisé pour les cultures primaires est constitué par une couche de coagulum plasmatique recouvrant la paroi du récipient. Depuis BURROWS (29), le plasma de coq est préféré, à cause de la consistance ferme et la parfaite transparence du coagulum qu'il forme après addition de l'extrait embryonnaire de poulet.

C'est donc dans ce coagulum plasmatique que l'on dépose les fragments tissulaires. De même, le coagulum peut favoriser le développement des cultures préparées à partir des suspensions cellulaires. Le plasma agit non seulement en tant que support mécanique de la culture mais également en tant que source de substances nutritives et facteur de conditionnement de la surface de verre sous-jacente (PARKER, 119).

Les cultures qui se développent à partir du matériel ainsi explanté ne sont pas toujours sans action sur le support plasmatique. Nombre de tissus possèdent des enzymes protéolytiques qui liquéfient plus ou moins rapidement le coagulum, rendant l'amarage de la culture difficile à maintenir. Il est cependant possible de prévenir, dans une large mesure, ce phénomène en ajoutant au milieu le facteur anti-protéolytique isolé du soja, comme le proposent FISCHER (58) ainsi que MORGAN et PARKER (108).

A la place du plasma, LELLING (53) a préconisé l'utilisation du fibrinogène de poulet, PORTER et HAWN (125) celle du fibrinogène bovin.

Bien que le support en plasma coagulé favorise la croissance de la culture, il est le plus souvent possible d'obtenir les cultures étalées directement sur la paroi du récipient ou sur une lamelle de verre glissée dans le tube de culture (YOUNGNER, 156; cf. PARKER, 119). Le verre borosilicique (Pyrex) est le plus habituel, mais il est possible d'utiliser les supports en d'autres matières (perspex, polystyrène, cellophane, Formwar, Araldite, etc.) (cf. PAUL, 120; BARSKI, 8, 19). S'il est nécessaire de fixer les fragments de tissu contre la paroi du récipient ou si les cellules de la culture n'adhèrent pas d'elles-mêmes sur la paroi on peut éventuellement recouvrir la culture d'une feuille de cellophane (ROSE et coll. 137) ou de cellophane perforée (EVANS et LARLE, 56) qui assurent, en même temps, un "microconditionnement".

La culture sur verre a l'avantage de la simplicité, élimine le problème de la liquéfaction du plasma coagulé et permet à la préparation de gagner en qualité optique. Elle est utilisée surtout pour le maintien des souches cellulaires déjà adaptées à la vie "in vitro".

LEIGHTON (86) a introduit, dans un but plus spécial, une autre sorte de support de culture, à savoir une couche finement spongieuse de cellulose. En se développant sur cette matrice cellulosique mais en milieu liquide, les cellules colonisent les mailles et les alvéoles de cellulose et s'organisent alors en trois dimensions. Ainsi se constitue une organisation tissulaire secondaire à laquelle l'éponge fournit un pseudo-stroma.

C. RÉCIPIENTS DE CULTURE.

Le récipient de culture élémentaire est constitué par le dispositif de la culture en goutte pendante (CARRELL et BURROWS, 35), où les fragments de tissus sont disposés dans une goutte de coagulum fixée sur la face inférieure d'une lamelle de verre. Le tout est placé contre une lame de verre excavée. MAXIMOW (100) a modifié cette technique en établissant les cultures sur une lamelle supplémentaire que l'on colle contre la lamelle-support et qui reste, de ce fait, à l'abri des infections extérieures. MURRAY et STOUT (112) ont beaucoup utilisé

la technique de MAXIMOW pour les cultures de courte durée des tumeurs humaines aux fins du diagnostic "in vitro".

Les récipients actuellement les plus utilisés sont, cependant, les bouteilles et les tubes aplatis (cf. PARKER, 119). La culture se développe sur leur paroi aplatie, soit directement sur verre, soit dans une couche mince de plasma coagulé; l'orifice du récipient est facilement stérilisable par la flamme, ce qui permet de renouveler facilement le milieu nutritif et de boucher le récipient stérilement.

Selon les besoins de l'expérience, les cultures peuvent être établies soit dans des bouteilles à grande surface, comme les bouteilles de ROUX et de KOLLE, ou bien dans les flacons aplatis de CARROLL, de volume plus réduit, ou encore dans les tubes aplatis introduits par LLIGHTON (87) et par BARSKI (9).

Certes, l'épaisseur de la paroi du récipient et ses qualités optiques empêchent d'examiner directement la culture sous le microscope au fort grossissement. Si l'on prévoit des observations au grossissement important, il est nécessaire d'établir les cultures non pas sur la paroi du récipient, mais sur une lamelle de verre déposée sur le segment plat d'un tube aplati. Pour l'observation, la culture sur lamelle est retirée du tube et examinée soit à l'état vivant, après avoir été montée dans une chambre à perfusion spéciale, soit après fixation et montage sur lame histologique (cf. chap. III). Notons que les cultures sur lamelles en tubes trouvent une excellente application, entre autres, dans les expériences où l'on se propose d'étudier et de comparer les effets de plusieurs facteurs ou substances sur une série de cultures identiques. C'est ainsi que cette technique a pu servir, par exemple, aux tests d'activité des composés anti-tumoraux "in vitro" (cf. chap. V.).

D. MILIEUX NUTRITIFS.

Les milieux qui permettent le maintien prolongé ou indéfini des cellules en culture "in vitro" sont constitués, le plus souvent, par le mélange, en différentes proportions, des milieux chimiquement déterminés (solutions salines minérales équilibrées, ainsi que solutions d'acides aminés, de vitamines et

d'autres substances chimiquement définies) et des liquides organiques naturels chimiquement non définis (sérum, liquide amniotique, etc.). Il est devenu habituel d'y ajouter des antibiotiques pour prévenir l'infection de la culture.

1. Milieux chimiquement déterminés.

a) Solutions salines équilibrées.

Elles sont composées de sels minéraux dont le rôle est de fournir des ions minéraux physiologiquement indispensables et d'assurer la stabilité du pH ainsi que de l'isotonie osmotique de la culture. A elle seule, une solution saline équilibrée ne permet pas la survie "in vitro" au delà de quelques heures. Elle peut cependant être utilisée telle quelle pour les lavages des tissus avant l'explantation ou pour les récoltes de cellules lors de repiquages.

Les plus habituellement employées sont la solution PBS (DULBECCO et VOLT, 47) et celle de HANKS (69), cette dernière contenant, en plus des sels minéraux, du glucose.

b) Solutions de composés organiques chimiquement déterminés.

Les substances nutritives nécessaires à la vie de la culture "in vitro" sont apportées principalement par des solutions de compositions complexes contenant acides aminés, glucides, certaines métabolites intermédiaires, vitamines et sels minéraux, le tout en proportions et quantités déterminées (cf. PARKER, 119). Leur emploi rend aujourd'hui les conditions métaboliques "in vitro" plus précises et mieux contrôlables qu'à l'époque de l'utilisation exclusive des liquides biologiques de composition chimique non déterminée.

Parmi le grand nombre de telles solutions nutritives chimiquement définies signalons les trois qui sont les plus utilisées pour la culture de tumeurs humaines "in vitro": le milieu 199 de PARKER et coll. (107), le milieu de base d'EAGLE (48) et le milieu NCTC 109 d'EVANS et coll. (55,27). Ce dernier, très complet et remarquablement bien équilibré, nécessite cependant l'adjonction d'un ingrédient à grosses molécules, la méthyl-cellulose. Celle-ci semble intervenir non pas dans la nutrition de cellules mais plutôt dans l'état physico-chimique, assurant une pression oncotique favorable.

2. Liquides organiques chimiquement indéterminés

Les sérum, homologues ou hétérologues, représentent les liquides organiques

les plus communément utilisés pour la préparation des mélanges de milieu nutritifs pour les cultures "in vitro". Comme LAGLE (49) l'a démontré, c'est principalement par un facteur lié aux protéines sériques non dialysables que les sérums favorisent la croissance cellulaire "in vitro".

Certains sérums individuels, même homologues, peuvent être toxiques pour la culture. Cette toxicité peut diminuer si l'on décomplémente le sérum par chauffage à 56° pendant 1 heure (cf; PARKER, 119).

Pour les explantations primaires et pour les premiers repiquages des tumeurs humaines, le sérum humain est préférable (10 à 40 p. 100 du milieu total). Par la suite, si les cultures s'adaptent à la vie "in vitro" en se stabilisant en souches cellulaires, il est possible de réduire la proportion du sérum dans le milieu et utiliser éventuellement non pas le sérum humain mais un sérum hétérologue (sérum de veau ou de cheval).

A la place du sérum, il est parfois possible d'introduire dans le milieu nutritif d'autres liquides organiques, principalement le liquide amniotique bovin (MALHERBE, 99), (LINDERS, 54) et le liquide ascitique humain (LJUNGREN, 95).

En dehors des sérums ou de leurs succédanés, il peut être utile d'ajouter aux cultures dont on veut stimuler la croissance, de l'extrait embryonnaire de poulet ou de veau (CARREL, 32). Cet extrait est d'ailleurs toujours présent comme élément du milieu lorsque la culture est établie sur un support de plasma coagulé.

D'après KUTSKY et coll. (81), l'effet de l'extrait embryonnaire sur les cultures serait dû à sa fraction nucléo-protidique. BARSKI et coll. (15) ont mis en évidence une diminution de la valeur nutritive des milieux de culture complets (contenant le sérum et l'extrait embryonnaire) après l'élimination, par l'ultracentrifugation, des protéines de poids moléculaires de 150 000 et plus.

E. CONDITIONS PHYSIQUES NECESSAIRES AUX CULTURES DE TISSUS "IN VITRO"

On conçoit facilement que les conditions physico-chimiques idéales pour la survie et pour la propagation de cellules "in vitro" seront celles qui se

rapprochent le plus des conditions de vie dans l'organisme.

a) La température

L'optimum thermique se situe, pour les cellules des mammifères, entre 37° et 38°. L'augmentation de la température de l'étuve au-dessus de ces valeurs est rapidement nocive: à 42°, les cellules ne survivent généralement que pendant 12 à 24 heures, à 45° la mort cellulaire survient en moins de 60 minutes.

L'abaissement de la température au-dessous des chiffres de l'optimum entraîne une diminution du nombre de mitoses et un ralentissement des échanges métaboliques. TIMOFLEYEVSKI (149) utilise les températures sub-optimales pour favoriser, par ralentissement des mitoses, la différenciation cellulaire dans les cultures de certaines tumeurs humaines (cf. chap. IV).

b) La pression osmotique

La pression osmotique physiologique est un autre facteur important à respecter dans les cultures "in vitro". A la température de 38°, son optimum est $\Delta = - 0.63$. Les cellules de mammifères supportent cependant les variations de l'ordre de 10 p. 100 en plus ou en moins sans aucune souffrance apparente (cf. PAUL, 120). La stabilité de l'optimum osmotique des cultures est essentiellement assurée par la présence des solutions salines équilibrées qui entrent dans la composition des milieux.

c) Le pH

Le pH du milieu baignant la culture doit être proche de la neutralité, l'optimum se situant entre pH 7,2 et pH 7,4. La constance du pH de cultures est maintenue grâce aux systèmes tampons à base de phosphates et de carbonates contenus dans le milieu et qui s'opposent aux variations du pH dues à la libération des catabolites, surtout acides lactique et carbonique. Si, au départ, le milieu de la culture est trop alcalin, il est utile d'introduire, dans le récipient, le mélange de l'air et de 5 p.100 de CO₂.

Un indicateur coloré, comme le rouge de phénol, ajouté au milieu, permet un contrôle approximatif facile de l'évolution du pH (cf. PARKER, 119).

Chapitre III

TECHNIQUES D'OBSERVATION

L'observation microscopique détaillée des cellules en culture "in vitro" peut se faire soit sur des préparations préalablement fixées et colorées, soit sur des cultures vivantes grâce aux dispositifs optiques spéciaux.

A. OBSERVATION DES CULTURES FIXÉES ET COLORÉES.

Les colorations ou procédés histo-chimiques telles qu'elles sont pratiquées sur les coupes histologiques classiques sont aussi bien réalisable sur les cultures cellulaires, avec cet avantage que les cultures établies en couche mince directement contre la surface de verre peuvent être fixées, colorées et montées directement sans passer par le stade d'inclusion en paraffine et coupe au microtome. A côté des colorations de routine qui permettent l'examen microscopique morphologique, il existe toute une gamme de colorations spécifiques qui rendent possible la recherche et l'identification des structures biochimiques particulières, comme systèmes enzymatiques déterminés, produits de sécrétion, substances intercellulaire, etc. (cf. PEARSE, 122; PARKER, 119).

Pour l'examen morphologique de base des cellules tumorales humaines cultivées "in vitro" sur verre ou en coagulum plasmatique on peut utiliser, par exemple, la coloration de MAY-GRUNWALD-GILMSA modifiée (cf. PARKER, 119) ou celle d'hématoxyline-éosine que nous pratiquons couramment.

B. OBSERVATION DES CULTURES VIVANTES.

Par le truchement de systèmes optiques particulières, à savoir la microscopie à contraste de phase et la microscopie interférentielle, il est possible de saisir parfaitement tous les détails des cellules à l'état vivant. Ainsi, par exemple, HOSKINS et MONTGOMERY (75) ont observé les noyaux de la souche cancéreuse humaine HeLa; ROSE, les inclusions cytoplasmiques de cette même souche

(135) ainsi que l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique des cellules des mélanomes humains (136); SYKES et coll. (148) et ROTTINO (138) les inclusions cytoplasmiques dans les cellules provenant des ganglions hodgkiniens; HSU (77) le déroulement des mitoses dans les cultures de la souche HeLa.

C. MICROCINEMATOGRAFIE DES CELLULES "IN VITRO"

L'image dynamique de la vie cellulaire et ses modifications sous l'influence des facteurs expérimentaux les plus divers (infection, substances cytostatiques, cellules étrangères, carences métaboliques) peut être enregistrée grâce aux prises de vues microcinématographiques. Par le ralentissement de la cadence de prises de vues on obtient, à la projection du film, une accélération qui met remarquablement en évidence les phénomènes cellulaires lents qui échapperaient à l'observation microscopique directe. Par analyse des séquences ainsi enregistrées on peut suivre les mouvements des structures cytoplasmiques, la formation des vacuoles, les étapes de la division cellulaire, les mouvements des membranes ondulantes, les migrations des cellules, etc. (POMERAT, 124; BUFFE, 28; McQUILKIN et EARLE, 101; HSU, 77; ROSE, 134; ROBINLAUX, 132; GEY, 61). BARSKI et ROBINLAUX ont inauguré, en se servant de cette méthode, une étude des réactions des cellules normales et cancéreuses infectées par différents virus (17, 18) et notamment des virus cancérigènes (13).

D. MAINTIEN DES CULTURES EN VIE PENDANT L'OBSERVATION PROLONGEE

Durant l'observation ou l'enregistrement cinématographique effectués au microscope à contraste de phase, la culture doit être maintenue dans des conditions optimales pour sa survie. Ces conditions sont réalisées à l'aide de chambres à perfusion dans lesquelles les cultures sont placées dans leur milieu avant l'observation. POMERAT (123), ROSE (134), PAUL (121), BARSKI et ROBINLAUX (16) ont mis au point différents types de telles chambres. Elles sont constituées par un ensemble de cadres et de supports où, après le montage, la culture est en contact avec un volume suffisant de milieu nutritif isolée de l'air ambiant, facilement accessible à l'examen microscopique au fort grossissement. En outre, un système de cannelures permet de renouveler ou de modifier le milieu à l'intérieur de la chambre sans interrompre l'observation ou la prise de vues

prolongées. La chambre à perfusion de BARSKI et ROBINEAUX (16), simple et facilement stérilisable, a l'avantage de pouvoir être montée avec les lamelles de culture de dimensions habituelles, directement retirées des tubes de culture standard.

Le maintien de la culture à la température optimale stable pendant l'observation est habituellement assuré à l'aide d'une enceinte chauffante englobant le microscope, ou à l'aide d'une platine chauffante qui reçoit la chambre à perfusion et est placée sur le plateau du microscope (ROBINEAUX et BARSKI, 1933). Ces dispositifs comportent un circuit de contrôle thermostatique.

Chapitre IV

VALEUR EXPERIMENTALE DES CULTURES DE TUMEURS HUMAINES "IN VITRO"

A. MORPHOLOGIE CELLULAIRE EN CULTURE "IN VITRO"

I. LES GRANDS TYPES CELLULAIRES OBSERVES "IN VITRO"

D'après leurs aspects en culture, les cellules peuvent être classées en plusieurs grandes catégories: cellules fibroblastiques, cellules épithélioïdes, cellules amœboïdes et cellules nerveuses (cf. FISCHER, 57; WILLMER, 152).

a) Cellules fibroblastiques.

Appelées encore mécanocytes ou "fibroblast-like cells", elles ont une forme plus ou moins fusiforme, souvent fourchue et possèdent des prolongements cytoplasmiques rétractiles. Leur noyau est ovale. La microcinématographie au ralenti met en évidence leur lente migration à l'aide de pseudopodes ainsi que les ondulations de leur ectoplasme.

Précisons que le terme "fibroblastique", utilisé en culture de tissus, ne présume en rien de l'identité de ces cellules avec les fibroblastes dans le sens histologique strict du mot. Ainsi, l'aspect "fibroblastique" en culture est propre, plus ou moins, en général, à tous les dérivés du mésenchyme: fibroblaste du conjonctif, myoblaste, chondroblaste, etc., en sont les exemples.

Dans les cultures de tissus tumoraux, les cellules fibroblastiques se rencontrent dans les sarcomes dont elles représentent l'élément constitutif principal, aussi bien que dans les épithéliomas où elles proviennent du stroma de la tumeur. Cependant, les cellules tumorales de certains carcinomes pourraient prendre "in vitro" également l'aspect fibroblastique, (BARON et REBSON, 7).

Si nous observons l'excroissance fibroblastique dans une culture établie par explantation de fragments tissulaires, nous pouvons noter que les cellules forment une couronne, souvent polystratifiée, en rayons de roue, autour des fragments. Cette structure radiale est parfois moins régulière, surtout dans les cultures de sarcomes où il n'est pas rare d'observer la formation de tourbillons cellulaires.

Dans les cultures établies à l'aide de suspensions de cellules fibroblastiques dispersées, ces cellules forment, le plus souvent, des réseaux de mailles parfois enchevêtrés.

b) Cellules épithélioïdes. (épithéliocytes, "epithelium-like cells").

Elles apparaissent dans les cultures en formant des plages et des languettes constituées d'une seule couche de cellules polygonales ou arrondies, étalées côte-à-côte sur le support en une mosaïque continue. Les noyaux des cellules épithélioïdes sont, en général, ronds et situés au centre de la cellule. La microcinématographie au ralenti révèle les ondulations des voiles cytoplasmiques périphériques.

Les cellules épithélioïdes représentent l'élément principal des cultures de la plupart de tissus épithéliaux et glandulaires.

c) Cellules amoeboïdes (macrophages, cellules mobiles, amoebocytes).

Se caractérisent par leur migration relativement très rapide par rapport aux autres constituants de la culture. Ces cellules se déplacent en émettant des pseudopodes très mobiles et contractiles, souvent munis de voiles ondulants à leurs extrémités. La forme des cellules amoeboïdes varie constamment: elle peut être successivement allongée, étoilée, triangulaire, piriforme, etc.

Provenant des cellules conjonctives libres, des cellules lymphoïdes et des leucocytes, les cellules amoeboïdes apparaissent dans les premiers jours de la culture, pour s'effacer ou se transformer souvent par la suite.

d) Cellules nerveuses

Les cellules observées dans les cultures de tissus nerveux sont, en général, étoilées. Du corps cellulaire large, où l'on remarque un noyau central ou excentrique partent, lorsqu'il s'agit de cellules nerveuses nobles, des prolongements fins et très allongés, au nombre variable, qui forment des ramifications. Dans les cultures prolongées, il est parfois possible d'observer, à l'intérieur du cytoplasme, les corps de Nissl.

II. LE SYNDROME DE MALIGNITE CELLULAIRE "IN VITRO"

A première vue, la comparaison des aspects des cultures de cellules tumorales et de cellules normales de même origine histologique ne permet pas de distinguer des différences morphologiques marquées. C'est dans ce sens que CARREL et EBERLING (38) ont conclu leurs études morphologiques en affirmant qu'il n'existe pas de signes morphologiques de malignité "in vitro". W.H. LEWIS (93) qui a repris ce problème dans les conditions expérimentales plus perfectionnées a abouti à des conclusions plus nuancées en admettant que certains aspects sont plus fréquents dans les cultures de cellules malignes que dans celles de cellules normales. Comparant les cultures de sarcomes de souris avec celles de fibroblastes normaux de tissus adultes, LEWIS a ainsi observé que, en ce qui concerne les cellules malignes, les tailles cellulaires étaient en moyenne plus importantes, les cellules géantes plus fréquentes, les centrioles toujours de volume réduit, les mitochondries plus petits et plus nombreux, les noyaux en moyenne plus volumineux, la membrane nucléaire épaissie et les mitoses monstrueuses plus fréquentes.

Dans une revue récente, MURRAY (110) résume le problème en affirmant qu'il n'y a pas de critères morphologiques précis et de valeur absolue qui permettraient de reconnaître la cellule maligne du premier coup d'oeil. Elle propose, néanmoins, un tableau comparatif des caractères morphologiques et du comportement, d'où se dégage ce que MURRAY appelle le "syndrome de malignité cellulaire". Ainsi, selon cet auteur, les cellules malignes en comparaison avec les cellules normales présentent, plus souvent, d'importantes variations de tailles au sein de la même culture, une grande variabilité également de tailles des noyaux, des noyaux vésiculaires et a membrane plus épaisse, des nucléoles volumineux et de forme irrégulière, un appareil de Golgi plus marqué, une basophilie cytoplasmique plus prononcée, des mitoses monstrueuses plus fréquentes, la formation de tourbillons cellulaires, une tendance à une protéolyse importante du coagulum plasmatique.

C'est en recherchant ces divers caractères et en évaluant leur importance que l'observateur expérimenté peut juger, dans une certaine mesure, si une population cellulaire est maligne ou non.

III. QUELQUES EXEMPLES DE LA MORPHOLOGIE DES TUMEURS HUMAINES "IN VITRO"

De nombreux auteurs ont cultivé "in vitro" des tumeurs humaines et décrit leur morphologie parfois spécifique. Nous ne citerons ici que quelques exemples de telles études.

Le morphologie des carcinomes gastriques et prostatiques en cultures a été décrité par COMAN (43). Il s'agissait de cultures de courte durée, sur coagulum plasmatique et en milieu riche en sérum humain. L'élément prédominant dans ces cultures était des cellules de type épithélioïde qui formaient des plages et des cordons, sans ébauches d'acini. Quelques cellules épithélioïdes migraient à distance des plages continues et se développaient en colonies nouvelles. COMAN a, par ailleurs, noté le fort pouvoir protéolytique de ces cultures.

Dans les cultures des carcinomes mammaires, ce même auteur (43) a observé une excroissance épithélioïde, mais, dans un cas, il a obtenu une excroissance uniquement de type fibroblastique, bien que sur les coupes histologiques la tumeur était identique aux autres. Le carcinome mammaire était cultivé également par WEITZMANN (150) qui a explanté en culture non pas la tumeur primitive mais le liquide pleural prélevé sur la malade. Dans ces cultures sur coagulum plasmatique, WEITZMANN a observé, à côté de cellules amœboïdes, des plages et des membranes continues composées de cellules polygonales, identifiées par l'auteur comme étant les cellules malignes.

ORR et McSWAIN (117) ont explanté un grand nombre de carcinomes mammaires dans le but de vérifier un milieu de culture efficace, les carcinomes du sein étant réputés comme difficilement cultivables "in vitro". Ce milieu était particulièrement riche en liquides organiques humains et en extrait embryonnaire également d'origine humaine. L'excroissance en culture "in vitro" était constituée de plages épithélioïdes plus ou moins recouvertes par des cellules fibroblastiques du stroma et par des amœbocytes. Dans certaines zones la présence de fibroblastes semblait favoriser l'excroissance épithélioïde plus vigoureuse. Ayant explanté et observé dans des conditions analogues quelques prélèvements du tissu mammaire humain normal, ces auteurs ont noté que, comparées aux cellules normales, les cellules malignes présentaient des variations

plus importantes des tailles nucléaires, des noyaux irréguliers plus fréquents, des nucléoles plus volumineux.

LASFARGUES et OZZELLO (84) ont abordé la culture des carcinomes mammaires par une autre technique d'explantation originale utilisant une suspension cellulaire obtenue par dissociation mécanique des fragments tumoraux. Ils sont ainsi arrivés à accumuler dans leurs cultures des cellules presque exclusivement épithélioïdes, les cellules du stroma restant dans les fragments. Les cellules épithélioïdes s'organisaient "in vitro" en plages. L'addition d'acide folique dans le milieu d'une série de cultures secondaires a très nettement favorisé la croissance épithélioïde. La suppression de l'acide folique a, par la suite, provoqué une transformation fibroblastique d'éléments épithélioïdes. Notons que les cultures qui n'ont jamais reçu le milieu enrichi en acide folique ont gardé l'aspect épithélioïde. Certaines cultures de LASFARGUES et OZZELLO se sont stabilisées en souches cellulaires propagées très longtemps.

La culture des mélanomes malins a été entreprise par TIMOFEYEVSKI (149) dans l'espoir de déterminer "in vitro" l'origine histologique de ces tumeurs. Leur aspect cellulaire "in vitro" présentait, d'après TIMOFEYEVSKI, une ressemblance étroite avec celui des cellules gliales et des cellules nerveuses: des corps cellulaires volumineux portaient des prolongements cytoplasmiques très fins, en grand nombre. TIMOFEYEVSKI a, par conséquent, conclu à l'origine neurogène des mélanomes.

Nous devons à WELLINGS, BARISHAK et SIEGEL (151) une importante étude des mélanomes malins en culture "in vitro", au cours de laquelle les auteurs se sont efforcés d'identifier, par la morphologie et par certaines réactions cytochimiques, les différents types cellulaires rencontrés. Les auteurs classent les éléments cellulaires apparus de la façon suivante: (a) cellules rondes, migrant très rapidement et contenant des granulations typiques de mélanine: macrophages; (b) cellules rondes non-pigmentées, ne prenant pas l'impregnation argentique et ne donnant pas la réaction tyrosine-tyrosinase; non identifiées: (c) cellules fusiformes pigmentées ou non, à prolongement filiforme, donnant la réaction tyrosine-tyrosinase: mélanocytes malins; (d) fibroblastes banaux ne prenant pas les colorations citées mais associées aux fibres argentophiles. Remarquons que ces auteurs ne mentionnent pas les cellules "nerveuses" à

nombreux prolongements, signalées dans le travail de TIMOFLEYEVSKI (149).

COSTERO, POMERAT et coll. (44) se sont attachés aux études des cultures de méningiomes. Ils ont observé des cellules d'aspect épithélioïde, se groupant en amas et tourbillons, analogues à ce que l'on a décrit dans les cultures des corpuscules de PACCHIONI normaux. Dans les cultures d'un méningosarcome, COSTERO, POMERAT et coll. ont noté une très rapide croissance et une prédominance des cellules de type fibroblastique. Ils ont remarqué le caractère fortement protéolytique de ces cultures.

La morphologie de l'excroissance "in vitro" des ganglions de la maladie de HODGKIN a retenu l'attention de HOSTER et RLIMAN (76). Ils ont explanté une cinquantaine de ganglions hodgkiniens. Les cellules observées dans ces cultures étaient des types suivants: cellules amœboïdes rondes; cellules allongées formant un réseau; fibroblastes étalés et isolés; cellules géantes à 2-12 noyaux. D'après la prédominance et le rapport numérique de ces différents types cellulaires ainsi que d'après la présence ou l'absence des inclusions cytoplasmiques colorées par Soudan IV, HOSTER et RLIMAN ont classé les cultures des différents ganglions des malades hodgkiniens en trois groupes. Cependant, il ne paraît pas qu'il y ait de corrélation entre ces différents groupes et le stade évolutif de la maladie.

GRAND (67) décrit dans les cultures de ganglions hodgkiniens des cellules fibroblastiques, des cellules réticulaires et des lymphocytes mobiles, ainsi que des cellules géantes, dont il admet la parenté avec les cellules de STERNBERG. La coloration vitale au bleu de crésyl met en évidence des inclusions cytoplasmiques particulières dans la plupart de ces cellules.

MURRAY et STOUT (111, 112, 113, 114) ont publié plusieurs travaux mettant en évidence les aspects très caractéristiques d'un certain nombre de tumeurs humaines cultivées "in vitro", aspect utilisable pour la vérification du diagnostic histo-pathologique. Il s'agit, principalement, de neurinomes, de sympathomes embryonnaires, d'épendynomes et de certaines tumeurs des tissus somatiques mous. Nous les signalons plus en détail dans le chapitre V. - A, consacré aux applications diagnostiques de la culture de tissus.

B. L'ADAPTATION A LA VIE "IN VITRO"

Malgré les perfectionnements des conditions actuelles de la culture "in vitro", peu de cultures sont capables de se propager indéfiniment, le pouvoir d'adaptation à la vie "in vitro" étant variable d'un cas à l'autre.

Déjà lors de l'explantation en cultures primaires, des différences notables existent entre les degrés de croissance respectifs des prélèvements d'origine différentes.

Certains auteurs comme GRAND (68) affirment que, d'une manière générale, la croissance en culture "in vitro" des cellules malignes est plus rapide que celle des cellules normales. La même impression se dégage des expériences de MOORE (104) sur une série de carcinomes cervicaux humains dont la prolifération "in vitro" a été comparée à celle de cultures de l'épithélium cervical normal. Par contre, FISCHER et LAZER (59) ont remarqué que la croissance des cultures de sarcome de Rous était plus lente que la croissance des cultures de fibroblastes normaux. GLEY (62) prend à ce sujet une position plus nuancée en affirmant qu'il n'existe tout simplement aucune corrélation entre la malignité et la vitesse de croissance de la culture.

Le plus souvent, après l'explantation en culture "in vitro", apparaît d'abord une prolifération cellulaire considérable mais au bout de deux à trois mois de repiquage, le taux de cette prolifération baisse, souvent jusqu'à l'arrêt complet de mitoses et disparition de la culture. Cependant, il arrive parfois que pendant cette période de stagnation apparaissent des groupes de cellules qui semblent mieux adaptées aux conditions de la culture; elles prolifèrent activement et finissent par dominer la culture en se stabilisant et formant ce que l'on appelle une souche cellulaire, susceptible d'être propagée parfois indéfiniment par repiquages successifs. Comparée à la population cellulaire de la culture primaire dont elle dérive, une telle souche est fréquemment très différente. Sauf quelques rares exceptions, elle contient un seul type cellulaire morphologique, son activité métabolique est modifiée et son caryotype évolue

souvent vers une aneuploïdie et hétéroploïdie plus ou moins caractérisée. D'autres caractères, cependant, comme la réceptivité aux virus ou comme la présence de l'antigène d'espèce, restent assez fidèles au tissu d'origine, (BARSKI et coll. 14). Quant au mécanisme de cette adaptation à la vie "in vitro", la mutation et la sélection compétitive semblent y jouer un rôle prépondérant.

Les souches cellulaires stabilisées représentent un matériel de très grande valeur en cancérologie expérimentale. Elles rendent possible l'expérimentation sur des quantités importantes de cellules aux caractères bien définis, mettant en évidence les influences exercées "in vitro" par les facteurs les plus divers, artificiellement introduits, comme les virus, les substances hormonales, les métabolites, leurs antagonistes ou autres substances cytotoxiques.

Pour obtenir des populations cellulaires aussi uniformes que possibles, on fait recours à la technique de clonage (SANFORD, MARLE, LIKELY, 141; PUCK et coll., 127, 130; GOLDSTEIN, 65). Elle consiste en l'isolement "in vitro" d'une seule cellule dont les divisions successives donnent naissance à une "souche clonale".

Dans de nombreux laboratoires, on cultive, actuellement, un grand nombre de souches cellulaires diverses, d'origine maligne ou non, humaines ou animales. Nous en mentionnerons ici quelques unes, parmi les souches humaines cancéreuses les plus connues.

La souche HeLa de GEY et coll. (62) dérive d'un carcinome peu différencié du col utérin humain. En cultures sur verre depuis 1952, elle est composée de cellules polygonales ou allongées, se rapprochant du type épithélioïde.

MOORE et coll. (105) ont développé des souches à partir d'un carcinome malpighien du col utérin (souche "H. Ep. I"), d'un carcinome malpighien laryngé ("H. Ep. 2"), d'une métastase ganglionnaire provenant d'un carcinome malpighien de la muqueuse buccale ("H. Ep. 3"), ainsi que d'un rhabdomyosarcome de type embryonnaire ("H. Emb. Rh. I"). Avant les explantations en cultures "in vitro", ces tumeurs ont été d'abord transplantées sur des rats irradiés et cortisonés; ce passage temporaire en conditions hétérologues aurait favorisé, selon les auteurs, l'adaptation "in vitro".

La souche KB d'EGLE (50) a été isolée à partir d'un carcinome malpighien peu différencié du plancher de la bouche. Depuis le début, elle est propagée sur support de verre. Sa morphologie est de type épithélioïde.

Les souches cellulaires dites de Detroit ont été isolées par BERMAN, STULBERG et RÜDLE (22), à partir de prélèvements de moelle osseuse de patients cancéreux et de sujets normaux, ainsi qu'à partir d'épanchements pleuraux et d'ascites accompagnant des tumeurs malignes. Leur morphologie "in vitro" a graduellement évolué depuis l'aspect originel (larges cellules arrondies) vers l'aspect fibroblastique pour se stabiliser ensuite sous l'aspect épithélioïde.

NORRBY et coll. (116) ont isolé parallèlement deux paires de souches cellulaires isologues: carcinome du col utérin et épithélium cervical normal d'un même sujet d'une part, d'autre part papillome de la vessie et muqueuse vésicale normale de sujets différents. Dans les cultures des deux tissus tumoraux, les auteurs ont observé, dès le début, un pléomorphisme cellulaire important; les cultures des deux tissus normaux "in vitro" sont devenues pléomorphes seulement après cinq mois de culture. Les nombres chromosomiques des cellules des quatre prélèvements ont évolué "in vitro" parallèlement pour se stabiliser en hétéropléidie dispersée, avec des nombres modaux hypo-tétraploïdes voisins de 78. L'aspect morphologique des quatre souches, après deux ans de culture, est identique et de type épithélioïde. Les taux de prolifération cellulaire sont également proches.

Un autre exemple de souche cellulaire humaine d'origine non tumorale est fourni par la souche "TG" de BARSKI et coll. (14). Elle a été établie à partir de cultures de trompe de Fallope humaine normale. Les auteurs se sont entourés de précautions techniques particulières, de telle sorte que la contamination des cultures par des cellules d'une autre origine était exclue. Ils ont fait, par la suite, recours aux contrôles de l'identité et de l'authenticité de la souche par l'analyse des caractères chromosomiques, immunologiques et de réceptivité virale, qui ont confirmé entièrement le maintien dans cette souche de caractéristiques essentielles de cellules d'origine humaine. A partir des cultures, composées au début de cellules fibroblastiques aussi bien qu'épithélioïdes, la souche s'est stabilisée en prenant un aspect cellulaire plus uniforme, intermédiaire aux deux types.

C. DEDIFFERENTIATION ET REDIFFERENTIATION CELLULAIRE "IN VITRO"

Les conditions dans lesquelles la cellule se trouve en culture "in vitro" influencent profondément sa morphologie et ses fonctions. On admet généralement qu'une prolifération rapide "in vitro" va de pair avec une tendance à la simplification des structures cellulaires; si la prolifération de la culture est artificiellement freinée, des signes de la redifférentiation peuvent apparaître (CAMERON et CHAMBERS, 31; TIMOFEYEVSKI, 149).

Plusieurs facteurs interviennent dans ce phénomène. D'abord la diversité des cellules explantées, suivie de sélection en fonction de l'adaptabilité à la vie "in vitro". Les divers degrés de différenciation des cellules s'inscrivent ensuite dans le cadre des "modulations réversibles" de MURRAY.

MURRAY (110) souligne que les cellules d'un même tissu, cultivées "in vitro", apparaissent non pas sous une seule forme rigoureusement identique d'une cellule à l'autre, mais comme un éventail d'aspects "modulés". Pour citer un exemple, le muscle strié normal apparaît "in vitro" comme une population cellulaire dont la morphologie va des cellules amœboïdes **mobiles** en passant par les cellules fibroblastiques jusqu'aux cellules présentant des structures striées. Un fragment de rhabdomyosarcome explanté dans ces mêmes conditions, donne toujours, d'après MURRAY, un éventail morphologique encore plus large, enrichi de formes cellulaires bizarres.

Interviennent finalement, surtout si l'âge de la culture se prolonge, les cycles de mutations suivies de sélections compétitives.

En ralentissant, artificiellement, par l'abaissement de la température d'incubation et par l'espacement des renouvellements du milieu, la multiplication cellulaire et la croissance de la culture, certains auteurs ont essayé de déplacer l'éventail des aspects morphologiques vers la zone de différenciation spécifique. Ainsi, TIMOFEYEVSKI (149) ayant cultivé à une température suboptimale des explantations provenant des sarcomes fusocellulaires histologiquement non différenciés, a noté l'apparition de myoblastes typiques

reconnaissables grâce aux structures striées. Ce même auteur rapporte également l'observation en culture d'une tumeur histologiquement non déterminée où la culture prolongée au ralenti a permis de déceler la formation d'un pigment identifié comme mélanine, et poser le diagnostic d'un mélanosarcome. Dans ce même ordre d'idées, on peut évoquer l'apparition de cellules ciliées dans les cultures d'un épandymome histologiquement peu différencié, rapportée par MURRAY (114).

D. TRANSFORMATION ET CANCERISATION DES CULTURES "IN VITRO"

Le seul critère rigoureux actuel de l'acquisition de la malignité "in vitro" est l'aptitude de la culture à déterminer des tumeurs après l'inoculation à l'espèce animal isologue. L'inoculation de cellules cancéreuses à des être humains n'étant qu'exceptionnellement réalisable, nous comprenons facilement que les preuves de la cancérisation "in vitro" des cellules normales ont été apportées par des expériences effectuées avec un matériel autre que d'origine humaine, et qui sortent, par conséquent, du cadre de notre thèse. Disons néanmoins que nombreux auteurs ont obtenu des souches cellulaires malignes à partir des cultures de tissus d'animaux normaux, soit par l'anaérobiose intermittente, soit encore par la cancérisation dite spontanée (cf. la récente revue générale par BARSKI, 10).

On a cependant observé fréquemment des transformations morphologiques caractéristiques dans des cultures de tissus primitivement normaux d'origine humaine, modifications évoquant le "syndrome de malignité cellulaire". Des transformations de ce genre ont été observées par LEIGHTON (91) travaillant avec le tissu sous-cutané, SWIM et PARKER (147) avec une souche de cellules humaines embryonnaires, JORDAN (79) avec l'épithélium nasal. Dans toutes ces expériences le "syndrome de malignité cellulaire" est apparu de façon spontanée. Quant à l'explication du mécanisme de la conversion maligne "in vitro" dite spontanée, les facteurs responsables hypothétiques les plus souvent mentionnés seraient: l'action de constituants non contrôlables du milieu de culture et, en particulier, de constituants présents dans les sérums hétérologues, l'anaérobiose relative ou autres entraves métaboliques, la contamination involontaire et non contrôlée par un virus oncogène inconnu.

LASNITZKI (85) a obtenu des modifications morphologiques analogues au "syndrome de malignité cellulaire" après l'action des cancérigènes chimiques sur des cultures de cellules pulmonaires embryonnaires humaines. La cancérisation apparente des cultures de cellules humaines normales par le virus SV 40 a

été récemment rapportée par KOPROWSKI (80).

On peut donc, dans l'ensemble, admettre que la conversion maligne "in vitro" existe dans les souches cellulaires humaines au même titre que dans les souches cellulaires d'origine animale. Cependant, il reste à déterminer si l'apparition du "syndrome de malignité cellulaire" correspond obligatoirement et systématiquement à l'acquisition de la malignité réelle, vérifiable par l'isogreffa. Ceci est d'autant plus difficile que la malignité est une notion vaste, inséparable de la notion de degré.

SOUTHAM et coll. (145) ont inoculé à des malades cancéreux volontaires des cellules de la souche humaine de Chang, provenant à l'origine de la conjonctive humaine normale, mais suspecte de transformation maligne "in vitro". Ces auteurs ont noté l'apparition de nodules tumoraux à l'endroit d'inoculation dans 7 cas sur 13. Dans ces mêmes conditions, les souches cancéreuses connues comme telles ont provoqué 15 nodules sur 18 inoculations, tandis que les cultures de fibroblastes humains normaux n'ont déterminé aucune formation tumorale. Soulignons que ces expériences ont été conduites sur des sujets cancéreux, donc dans des conditions très spéciales, et arrêtées au moment de l'apparition des nodules, donc au bout d'un délai par trop limité.

D'autres auteurs ont essayé de mettre en évidence le pouvoir cancéreux des souches humaines provenant de cultures, à l'aide de transplantations hétérologues sur animaux. SCOTTI et coll. (143) ont inoculé les cellules de la souche d'origine maligne HeLa et celles de la souche, également maligne, KB, aux rats Wistar, par voie intra-cérébrale. Les tumeurs se sont développées uniquement chez les animaux pré-traités (irradiation totale par rayons X, administration de cortisone); chez les autres animaux, non préparés, il n'y avait pas de tumeur. Plus nuancés sont les résultats de l'hétérotransplantation dans les poches buccales de hamsters, entreprise par FOLEY et HANDLER (60). Des nodules ont été obtenus après l'inoculation de cellules humaines non malignes, le seuil étant de 10^6 cellules sur des animaux normaux, 10^4 cellules sur des animaux pré-traités par irradiation et cortisone. Les cellules de souches humaines malignes ont donné des tumeurs avec ^{des} inoculations moins importantes.

En définitif, bien que nous admettions par analogie avec les souches animales l'existence de la conversion maligne des cellules humaines "in vitro", nous ne disposons pas de critères absolus pour la mettre en évidence, l'homogreffe et l'isogreffe tumorales n'étant pas praticables chez l'homme. Seule la recherche plus approfondie de nouveaux critères de malignité, critères morphologiques, cinétiques, métaboliques, biochimiques, biophysiques, etc., pourra apporter une solution à ce problème.

2. ETUDES SUR L'INVASION CANCEREUSE DES TISSUS NORMAUX "IN VITRO".

Le cancer et son évolution étant définis essentiellement par les réactions entre le tissu de l'organisme-hôte et la tumeur, nous comprenons l'intérêt de la visualisation des interactions directes entre les cellules malignes et les cellules normales, associées "in vitro". Soulignons, cependant, que l'on ne peut guère s'attendre à saisir, à l'aide de la culture de tissus, autre chose que les facteurs dépendant directement des cellules confrontées, à l'exclusion des réactions de l'organisme dans son ensemble dont le rôle est certainement capital.

Les chercheurs qui ont abordé de telles études ont cependant utilisé, le plus souvent, des systèmes tissu normal - tissu malin d'origine animale. C'est en comparant le "comportement social" des cellules dans les cultures de sarcomes de souris d'une part, et de tissus normaux isologues de l'autre, que ABERCROMBIE et HAYSMAN (1) ont décrit le phénomène dit "d'inhibition de contact": la migration des cellules fibroblastiques normales serait inhibée et déviée de sa direction primitive par le contact d'une autre cellule; par contre, les cellules malignes ne changeraient pas de trajectoire et pourraient migrer en passant par dessus les cellules rencontrées.

C'est encore en travaillant sur le matériel cellulaire normal (myocarde embryonnaire) et cancéreux (fibrosarcomes N1 et M6) de la souris C3H, associés en culture "in vitro", que nous-mêmes avons mis en évidence, à l'aide de la microcinématographie au ralenti, des différences notables dans les comportements migratoires respectifs des cellules cancéreuses et des cellules normales: l'excroissance peu mobile et ordonnée du tissu normal a été énergiquement envahie par des cellules malignes enchevêtrées se déplaçant sans entraves dans la zone occupée par les cellules normales (BARSKI et BELEHRADSK, 11).

Il existe, cependant, quelques travaux de ce genre effectués sur les tissus normaux et cancéreux humains et dont les résultats, bien qu'ils n'aient pas été suivis par observation directe de cellules vivantes, sont analogues à ceux que

nous venons de citer. LEIGHTON et coll. (89, 90) ont explanté la souche cancéreuse HeLa dans les cultures des fibroblastes normaux provenant de prépuces humaines, cultures préalablement établies sur support spongieux (sponge matrix). Au bout de 3 à 4 jours, les cellules malignes infiltraient l'excroissance des fibroblastes normaux. Par la suite, les cellules normales disparaissaient pour laisser place aux cellules malignes. Au contact des fibroblastes normaux, les cellules cancéreuses présentaient des tailles plus importantes et leurs mitoses étaient plus fréquentes. Le processus d'envahissement n'était pas altéré par les modifications de la température et du milieu nutritif dont le but était de modifier la vitesse de prolifération des deux populations cellulaires confrontées; les auteurs concluent que l'envahissement n'est donc pas uniquement la conséquence de la rapide prolifération du tissu tumoral. Ces mêmes auteurs ont, par ailleurs, explanté la souche HeLa au contact du tissu synovial normal. Là encore, les cellules cancéreuses ont rapidement envahi l'excroissance du tissu normal. LEIGHTON décrit également une observation particulière où dans une culture mixte, les cellules cancéreuses ont été trouvées au contact des cellules conjonctives normales qui formaient une structure évoquant un capillaire. Il suppose avoir observé directement, "in vitro", la traversée de la paroi vasculaire par les éléments tumoraux, prélude à la métastase. Il considère qu'il serait profitable de chercher quel effet produisent, sur le processus d'envahissement "in vitro", les composés capables de modifier, d'une part, le pouvoir protéolytique ou les propriétés de la membrane des cellules malignes, d'autre part les propriétés de la substance fondamentale du tissu envahi.

WOLFF et coll. (153, 154) ont utilisé la méthode de culture organotypique pour associer "in vitro" des tumeurs malignes humaines aux explants de mésonephros embryonnaire de poulet. Dans ces cultures associées, l'organe embryonnaire est envahi par le tissu tumoral auquel il semble apporter des substances nutritives et un milieu biologique favorables à la conservation de sa structure histologique et de son pouvoir de prolifération. En effet, au contact du mésonephros, ces auteurs ont observé des véritables tumeurs miniatures dont l'organisation correspondait nettement à celle des tissus tumoraux originels.

F. RECHERCHES IMMUNOLOGIQUES

Les cultures "in vitro" de tumeurs humaines ont été utilisées soit comme source de matériel antigénique soit comme système-cible permettant de démontrer l'existence de réactions immunologiques.

BJORKLUND et BJORKLUND (25) ont utilisé des carcinomes humains, préalablement homogénéisés et délipidés, pour l'immunisation de chevaux par des injections sous-cutanées. Les sérums de chevaux ainsi préparés ont été introduits dans les milieux de cultures de tumeurs humaines. Sur les cellules de la souche HeLa, les auteurs ont observé un effet cytopathique important: rétraction de l'ectoplasme, arrêt de la pinocytose et des mouvements des membranes ondulatoires cytoplasmiques, cytolysé complète. Les sérums avaient une action analogue également sur d'autres tumeurs humaines "in vitro", mais étaient inactifs sur les cultures des cellules humaines normales. La fraction active des sérums était absorbée par les cellules humaines malignes mais non par les cellules humaines normales. On peut, cependant, douter de la valeur comparative du témoin "tissu normal" qui, dans les expériences des BJORKLUND, était représenté par des cultures primaires de fibroblastes embryonnaires normaux.

MOUINTAIN (109) a préparé un anti-sérum sur des lapins en leur injectant un broyat de cellules de la souche HeLa. L'anti-sérum obtenu avait un pouvoir cytopathique net sur les cultures de la même souche, pouvoir non altéré par le réchauffement à 56° C. Les essais n'étant pas pratiqués parallèlement sur des cultures de cellules homologues normales, il n'est pas exclu qu'il s'agissait d'un sérum anti-espèce.

MILLER et HSU (103) utilisant également la souche humaine maligne HeLa, ont obtenu, chez des lapins et des poulets, des anti-sérums qui exerçaient un pouvoir de lyse cellulaire non seulement sur la souche HeLa mais également sur nombre de tissus humains normaux "in vitro", ce qui confirme que les sérums préparés de telle manière ont un pouvoir anti-espèce humaine.

Nous avons déjà mentionné dans un chapitre précédent les travaux de SOUTHAM et coll. (145). Précisons que ces chercheurs ont inoculé sous la peau de l'avant-bras des volontaires humains, cancéreux ou non, des suspensions de cellules malignes préparées à partir de cultures. D'autres inoculations ont été pratiquées avec des cellules fibroblastiques humaines préparées à partir de cultures de tissus normaux non transformés. Par la suite, après 15 jours, les sites d'injections étaient excisés et examinés. Les constatations ont été les suivantes: aucune des greffes de cellules fibroblastiques supposées normales n'a pris; sur les 10 inoculations de cellules malignes aux volontaires bien portants, 4 seulement ont donné des nodules retrouvés à la biopsie; sur les 19 greffes des cellules malignes aux volontaires cancéreux, 15 ont développé des nodules tumoraux. Une résistance plus importante à l'homo-greffe chez les sujets non cancéreux est donc évidente. Par ailleurs, le taux sérique de properdine était constamment bas chez les sujets cancéreux étudiés. Quant aux éventuels anticorps sériques, capables de réagir contre les cellules préalablement inoculées, leur présence n'a pas été détectée.

Au cours d'une autre étude, SOUTHAM et MOORE (144), en inoculant des souches cancéreuses humaines à des volontaires, ont mis en évidence un état d'immunité induite systémique consécutif à l'inoculation préalable du même matériel dans un autre site. Le deuxième implant a été, en règle, rejeté plus rapidement que le premier, sans qu'il y ait eu de formation d'anticorps sériques. L'inoculation préalable de cellules humaines normales n'accélérait pas le rejet de la greffe cancéreuse.

Dans la lumière des résultats expérimentaux actuellement disponibles, l'existence d'un antigène tumoral spécifique peut être supposée sans qu'elle ait pu être définitivement prouvée (MILGROM 102). Cet antigène tumoral, s'il existe, est certainement doué d'un pouvoir antigénique faible, donc facilement masqué, dans les expériences réalisées avec les sérums hétérologues, par les effets dus aux antigènes de l'espèce. D'autre part, il demeure douteux, à la lumière de l'ensemble de ces résultats, qu'il existe un "antigène tumoral" commun à tous les cancers humains indépendamment de leur origine histologique.

G. RECHERCHES RADIOBIOLOGIQUES

La technique d'évaluation quantitative des conséquences de l'irradiation aux rayons X "in vitro", technique décrite par PUCK et coll. (130) et qui consiste en la détermination, par rapport à des témoins non irradiés, du pourcentage de cellules individuelles capables, après irradiation, de se multiplier pour former des colonies ("plating efficiency"), a permis d'aborder, "in vitro", l'étude de certains problèmes de radiobiologie.

A l'aide de l'analyse des courbes "dose/survie" obtenues par ce procédé, PUCK (127, 128) a comparé les radiosensibilités de la souche HeLa et d'autres souches cellulaires humaines ou animales, d'origine normale ou cancéreuse. Il a émis une hypothèse concernant le rôle de l'hyperploïdie dans la radiosensibilité "in vitro", montrant que les cellules à nombres chromosomiques plus élevés que le nombre diploïde normal et possédant, par conséquent, certains chromosomes en plusieurs "copies", sont plus résistantes aux rayons X. Ayant calculé la dose létale moyenne rapportée à une cellule, PUCK obtient le chiffre de 50 r pour une cellule humaine diploïde, des valeurs deux ou trois fois plus élevées pour les cellules hyperploïdes. Cependant, deux souches cellulaires à nombre chromosomique voisin peuvent avoir des degrés de radiosensibilité différents, comme PUCK l'a montré pour la souche HeLa et une souche humaine d'origine conjonctive. La très petite valeur de la dose létale moyenne rapportée à une cellule plaide, selon PUCK, en faveur de l'hypothèse selon laquelle la destruction d'un seul locus sensible, de dimensions d'ordre moléculaire, suffirait pour provoquer la perte de la capacité de division de la cellule.

L'examen des chromosomes des cellules irradiées permet de découvrir des ruptures chromosomiques; d'après la dose totale et la fréquence de rupture, PUCK évalue la dose correspondant à une rupture aux environs 20 - 40 r. par cellule. Pour des doses plus importantes on assiste à plusieurs ruptures par

cellule et parfois à des réarrangements partiels des fragments chromosomiques, donnant des figures chromosomiques complexes.

PUCK (126, 129) montre également que l'effet des radiations se manifeste par l'apparition de mutants à caractères morphologiques et chromosomiques différents de ceux des cellules de la même souche non irradiées. Ces mutants sont, en règle, au moins aussi radiosensibles que les cellules de départ, ce qui exclut l'hypothèse de leur apparition par sélection et prouve la réalité de la mutation.

BASES (20), toujours à l'aide de la technique de PUCK, a observé l'effet des rayons X sur des cellules de la souche HeLa en présence d'un radioprotecteur (AET, = Bromide - hydrobromide d'amino-éthyl isothiuronium), ainsi qu'en présence de la 6-Mercaptopurine. L'AET introduit dans la culture avant l'irradiation exerçait une action radio-protectrice nette. Par contre, l'addition de la 6-Mercaptopurine dans les cultures, avant ou après l'irradiation, entraînait un effet destructif plus important que l'irradiation seule ou le composé seul. Dans une autre étude, BASES (21) a mis en évidence la sensibilisation des cellules de la souche HeLa à l'action des rayons X par l'Actinomycine D^{et} par l'eau lourde (D₂O).

H. ETUDES BIOCHIMIQUES SUR LES TUMEURS HUMAINES CULTIVEES "IN VITRO".

Pour illustrer les possibilités offertes par les méthodes de la culture de tissus dans le domaine des études biochimiques, citons quelques travaux récents représentatifs des tendances actuelles.

On sait que, selon l'hypothèse émise par WARBURG il y a trente ans, la malignité apparaîtrait comme une conséquence de la conversion du métabolisme cellulaire respiratoire en glycolyse aérobie. Vérifiant cette hypothèse sur les cultures des tissus humains cancéreux et normaux, MOORE (106) a observé que la glycolyse anaérobie des fibroblastes humains normaux, fraîchement explantés "in vitro", a été moins élevée que celle de la souche cellulaire maligne H. Ep. 2 ainsi que celle de la souche de CHANG (souche provenant du tissu humain normal mais transformée au cours de passages successifs "in vitro"). Les différences métaboliques constatées sont uniquement quantitatives. LESLIE et coll. (92) sont parvenus à des conclusions analogues en comparant "in vitro" les métabolismes des cellules embryonnaires et des tumeurs humaines malignes. L'addition de l'insuline stimulait, cependant, le métabolisme des cellules malignes et n'influencait que peu celui des cellules normales.

L'équipement enzymatique des cellules cancéreuses a été l'objet des recherches réalisées en culture "in vitro". BARBAN et SCHULTZ (6) ont prouvé, dans les cellules de la souche HeLa, la présence de tous les enzymes du cycle de Krebs. HIRSCHBLRG (74) a démontré la très faible quantité d'azaguanine-desaminase dans les cellules du glioblastome humain, et la richesse en cette enzyme du tissu homologue normal.

L'effet de certaines hormones a été étudié. BINES, PLANLL et DAVID (24) ont observé l'inhibition de la croissance de la souche HeLa (carcinome cervical malpighien) sous l'influence de l'oestradiol ainsi que de la testostérone. Ces hormones ont été sans action sur les cultures des fibroblastes du col utérin humain normal et sur celles de l'épithélium cervical du rat.

BROCKMAN, KELLY et coll. (26) ont rapporté quelques aspects biochimiques qui accompagnent l'acquisition de la résistance à la 6-Mercaptopurine. Un clone de la souche humaine H. Lp.2, clone rendu résistant à la substance mentionnée, a été caractérisé par la perte de deux enzymes de synthèse des nucléotides: la IMP-Pyrophosphorylase et la GMP-Pyrophosphorylase.

I. RECHERCHES PHARMACOLOGIQUES

Dans la recherche systématique des nouveaux composés destinés à la chimiothérapie des tumeurs malignes, la culture de tissus humains représente un des moyens de sélection des substances à retenir, constituant une sorte de pont entre les expérimentations "in vivo" sur animaux de laboratoire et les essais cliniques.

Elle permet non seulement l'évaluation quantitative de l'action de la substance envisagée, mais également, et là est son immense avantage, l'observation directe de l'effet cytopathique au niveau cellulaire (MURRAY, 110; ROBINLAUX, 132; BUFFE, 28).

La méthodologie générale de ces tests est la suivante: les cultures de souches cancéreuses humaines ainsi que les cultures des tissus humains normaux sont maintenues en présence du composé étudié en diverses concentrations. L'état de chaque culture est ensuite évalué suivant le pourcentage des mitoses, la proportion des cellules dégénérées et le degré de l'accroissement ou, au contraire, de la dégradation cellulaire de la population; sont retenus pour l'étude ultérieure les composés qui exercent une action inhibitrice importante sur les cellules malignes et n'affectent que peu les cellules normales.

En analysant les résultats obtenus par de tels tests de sélection, il convient, néanmoins, de tenir compte des facteurs inhérents aux conditions de la vie "in vitro" soustraite aux influences de l'organisme entier. Ainsi seules les actions exercées directement au niveau cellulaire peuvent être révélées. Il est clair que, dans les cultures, les mécanismes de détoxication hépatique, d'élimination rénale, d'activation du produit (par un tissu autre que le tissu tumoral lui-même) n'interviennent pas. De même, l'absorption élective du produit par certains tissus de l'organisme et les modifications circulatoires éventuelles au niveau de la tumeur nous échappent entièrement.

D'autre part, les différences entre les réactions des cellules malignes et des cellules normales n'apparaissent pas toujours très nettement, d'autant plus qu'il est difficile de trouver, pour chaque tumeur, un tissu normal homologue et histologiquement strictement équivalent.

Pour ces raisons, devant les premiers résultats des sélections de composés anti-tumoraux pratiquées "in vitro", EAGLE et FOLLEY (51, 52) se sont déclarés sceptiques en ce qui concerne la valeur de la méthode. Par contre, BILSELE (23) qui a étudié "in vitro" l'action des purines substituées et de leurs ribosides en utilisant, entre autres, les souches HeLa, H. Ep. I, H.Ep.2 et les cultures de fibroblastes humains adultes, a prouvé l'utilité de la sélection à l'aide de cultures. HIRSCHBERG (73) a travaillé sur des cultures primaires de glioblastomes humains en vérifiant l'action de 150 différents composés, cherchant les relations entre l'activité et la structure chimique. Signalons encore les tests de sélection entrepris par COBB (41, 42) sur un très grand nombre de différents tissus humains tumoraux et normaux.

Nous verrons plus loin que le même principe est utilisé à des fins de sélection thérapeutique pour les patients individuels.

Chapitre V.

APPLICATIONS PARACLINIQUES POSSIBLES DES CULTURES DE
TUMEURS HUMAINES. PERSPECTIVES.

A. LA CULTURE DE TISSUS COMME MOYEN AUXILIAIRE DU DIAGNOSTIC
HISTO-PATHOLOGIQUE

Nous avons déjà mentionné les "modulations" morphologiques de cellules en culture "in vitro". Soulignons ici que l'éventail de ces modifications reversibles de la morphologie peut, dans certains cas, constituer un moyen supplémentaire d'identification de la tumeur et de son origine, complétant avantageusement, sans cependant le remplacer, l'examen histo-pathologique classique. D'une manière générale, les structures caractéristiques apparaîtront d'autant plus nettement que la prolifération cellulaire sera plus lente et, par conséquent, sa différenciation maintenue ou favorisée. D'autre part, les cellules en culture étant librement étalées, nous pouvons reconnaître certains aspects spécifiques qui nous échapperaient lors de l'examen de la même tumeur sur des coupes histologiques.

Toutes les tumeurs ne se prêtent pas à ces méthodes d'investigation diagnostique "in vitro". Ainsi les carcinomes tendent, généralement dans des conditions habituelles de culture, vers un type cellulaire relativement peu différencié et perdent l'architecture tissulaire que l'on saisira mieux sur les coupes histologiques classiques.

Signalons cependant la tentative de GLATTHAAR (64) de se baser pour ce qu'il appelle "le jugement pronostique" sur l'aspect morphologique des cultures établies à partir de prélèvements colposcopiques des lésions précancéreuses du col utérin. L'imminence de la conversion maligne pourrait être suspectée, selon GLATTHAAR, lors de l'apparition dans les cultures des cellules de tailles inégales, fortement protéolytiques, avec des noyaux volumineux à nucléoles bizarres, formant une excroissance désordonnée.

Dans le domaine des tumeurs du tissu nerveux, la culture "in vitro" met en évidence, parfois d'une façon spectaculaire, des caractères morphologiques spécifiques de cellules nerveuses, rendant le diagnostic souvent plus facile et plus sûr que celui qui est basé sur le seul examen classique sur coupes

histologiques. Particulièrement démonstratif est le cas du sympathome embryonnaire (MURRAY et STOUT, 112). Autour des fragments de cette tumeur explantée "in vitro" apparaissent des plages composées de neuroblastos typiques; cellules piriformes qui possèdent un ou deux neurites, prolongements effilés de cinq à dix fois plus longs que le corps cellulaire. Ces images très spécifiques et sans équivoque sont reconnaissables déjà après 24 à 48 heures de culture. Les neuroblastomes des nerfs périphériques donnent "in vitro" une excroissance des cellules épithélioïdes étoilées et multipolaires à prolongements courts (MURRAY et STOUT, 114). Le neurinome (ou schwannome) offre, lui aussi, un aspect spécifique lorsque cultivé "in vitro". Comme MURRAY (114), ainsi que CHLOPIE (40) l'ont décrit, l'excroissance cellulaire de cette tumeur est composée de cellules fusiformes, greles et allongées, identifiables comme cellules de la gaine de Schwann. LANE, MURRAY et FRASER (82) ont publié l'observation d'un cas clinique où la culture "in vitro" a permis de poser le diagnostic d'un neurinome inclus dans un thymome de localisation pulmonaire. MURRAY et STOUT (115) insistent également sur l'utilité de la culture de tissus, pour le diagnostic différentiel entre les neurinomes malins et certains fibrosarcomes, les neurinomes malins apparaissant en culture comme composés de cellules schwanniennes bien distinctes des fibroblastes sarcomateux. L'explantation "in vitro" des épendymomes permet d'observer les cellules ciliées en activité; MURRAY et STOUT (114) se sont basés sur cette particularité pour vérifier le diagnostic d'un épendymome métastatique au niveau de la région crurale.

L'aspect des cultures établies à partir des ganglions de la maladie de Hodgkin est également caractéristique et utilisable éventuellement pour la vérification du diagnostic. A côté des fibroblastes, des cellules réticulaires et des lymphocytes, on retrouve dans ces cultures, de larges cellules à plusieurs noyaux et à cytoplasme granuleux dont on peut admettre la parenté avec les cellules de STERNBERG-REED (GRAND, 67).

Les tumeurs des tissus somatiques mous constituent un autre domaine d'application possible de la culture "in vitro" à l'établissement du diagnostic différentiel.

Ainsi le mésothéliome pleural a pu être identifié, d'après l'aspect épithélioïde de son excroissance "in vitro", dans un cas où le diagnostic histo-

pathologique posé à l'examen des coupes classiques concluait à un fibrosarcome (SANO et coll. 142).

TIMOFLEYEVSKI (149) ayant observé l'apparition de myofibrilles dans les cultures de quelques tumeurs, d'abord définies à l'examen histo-pathologique comme des sarcomes fusocellulaires, a pu rattacher ces cas aux rhabdomyosarcomes. Le même auteur a prouvé, comme nous l'avons déjà mentionné, la production de mélanine dans les cultures d'une tumeur non pigmentaire atypique, et posé le diagnostic du mélanoblastome.

Les liposarcomes sont reconnaissables en culture, par rapport aux fibrosarcomes, grâce aux granulations lipidiques apparues dans les cultures et grâce aux noyaux ronds de leurs cellules fusiformes (STOUT, 111, 146).

Si, actuellement, l'identification des tumeurs "in vitro" est basée sur la morphologie de la population cellulaire, d'autres critères pourraient être introduits, dans l'avenir. En employant certaines techniques d'explantation particulières, il est parfois possible de provoquer "in vitro" une réorganisation cellulaire plus spécifique, révélant la nature et l'origine de la tumeur. Rappelons, à cet effet, la méthode de LLIGHTON (88); dans les cultures sur support spongieux ("sponge-matrix"), il a obtenu des regroupements cellulaires caractéristiques de différents carcinomes, regroupements qui rappelaient parfois même des acini glandulaires ou des perles de kératinisation. De même, L. WOLFF et coll. (153, 154) ont mis au point une technique spéciale qui associe "in vitro" la tumeur étudiée au mésonephros de poulet. Cet organe embryonnaire apporte aux cellules tumorales des substances nutritives et leur offre un milieu favorable à la reconstruction d'une architecture plus élaborée que dans les cultures simples.

C'est également l'étude du comportement dynamique des cellules "in vitro" (POMERAT, 124; McQUILKIN et LARLE, 101) qui nous semble pouvoir apporter de nouveaux critères diagnostiques. Elle pourrait révéler, à l'aide de la micro-cinématographie au ralenti, les caractères particuliers de la migration des cellules de différentes origines. Le comportement des organites cellulaires pourrait être analysé par ce même moyen. L'impression qui se dégage, dès maintenant, de telles observations est que, en général, les prolongements et les

voiles cytoplasmiques des cellules malignes sont animés de mouvements plus énergiques qui les distinguent des cellules normales. La migration des cellules peut présenter des particularités intéressantes: ABLRCROMBIE (1) a décrit, comme nous l'avons déjà mentionné, dans les cultures de tumeurs animales, des phénomènes "d'inhibition de contact" qui apparaissent lors de la rencontre entre cellules. Les cellules malignes seraient reconnaissables par leur "comportement social" particulier, directement lié, comme les auteurs le supposent, au pouvoir envahissant des tumeurs. Enfin, le comportement des cellules exposées à l'action d'un champ électrique, dans des cuves électrophorétiques où elles se déplacent en fonction de leur charge, pourrait également apporter de nouvelles précisions sur les caractères distinctifs des cellules de différentes origines. En effet, AMBROSE et coll. (3) ont démontré que la charge négative des cellules d'une tumeur rénale de hamster était sensiblement plus élevée que celle des cellules homologues normales. Ils ont observé une différence analogue entre les cellules d'un hépatome de rat et les cellules hépatiques normales de la même espèce. Citons encore la publication de PURDON, AMBROSE et KLEIN (131) dans laquelle les auteurs décrivent l'augmentation par paliers de la charge électrique des cellules d'un sarcome expérimental de souris, l'augmentation qui allait de paire avec l'adaptation de la tumeur à la croissance sous forme ascitique et avec l'augmentation de la malignité de ces cellules.

Pour chaque tumeur humaine explantée "in vitro" et parallèlement aux conclusions du diagnostic histo-pathologique classique, il serait ainsi possible d'établir une sorte de "fiche de signalement" groupant les différents caractères de la tumeur en culture: modulations de la morphologie cellulaire, organisation de l'excroissance, mouvements des organites, des prolongements et des voiles cytoplasmiques, interactions cellulaires, caractères de la migration, comportement à l'électrophorèse, équipement en enzymes particulières, exigences métaboliques, etc. L'évaluation de tous ces caractères complétant le diagnostic histologique pourrait constituer la base d'une classification de tumeurs moins statique et aussi plus biologique que celle que nous offre le seul examen de coupes histologiques.

B. ESSAIS DE L'ACTIVITE DES COMPOSES CHIMIO-THERAPEUTIQUES SUR CULTURES
DE TUMEURS HUMAINES INDIVIDUELLES.

Comme nous l'avons vu plus haut, la culture "in vitro" de tumeurs humaines est utilisée dans la sélection pharmacologique de nouveaux composés de chimiothérapie anti-tumorale. Une méthode analogue peut cependant faciliter le choix individuel de l'agent chimio-thérapeutique le plus actif à administrer à un malade donné, constituant un test semblable à l'antibiogramme pratiqué en thérapie anti-infectieuse.

De tels essais individuels sont réalisables grâce aux progrès des techniques de cultures de tissus dans la plupart des cas. Avec l'emploi de milieux et de méthodes actuellement disponibles, les tentatives d'explantation "in vitro" des prélèvements de biopsie sont couronnées de succès dans 55 à 60% des cas. D'autre part, si nous admettons que, sauf quelques exceptions, l'action essentielle des composés anti-tumoraux s'exerce directement au niveau des cellules malignes, nous devons la retrouver et pouvoir l'estimer en culture "in vitro" de ces mêmes cellules, malgré les restrictions que nous avons exposées plus haut.

L'existence d'une corrélation entre l'action antitumorale "in vivo" et "in vitro" a été vérifiée par COBB, WRIGHT et coll. (41, 42, 155). Ces auteurs ont suivi parallèlement les deux actions sur 131 malades présentant des tumeurs les plus diverses. Les composés utilisés étaient les suivants: méthotrexate, 5-Fluorouracil, TSPA, Chlorambucile, Melphalan, Di-hydro E 73, Actinomycine D et Puromycine. Une ou deux de ces substances ont été étudiées sur chaque tumeur "in vitro" avant d'être administrées au patient; leurs concentrations utilisées "in vitro" étaient les mêmes que les concentrations minimales provoquant des effets cytotoxiques sur des cultures de fibroblastes embryonnaires de poulet. Les cultures sont restées exposées à l'action des produits étudiés pendant 96 heures et ont été ensuite comparées aux cultures témoins parallèles cultivées sans le produit. Le degré de l'action de la substance anti-tumorale

"in vitro" a été évaluée dans chaque cas, selon deux classes: classe "0" (aucun effet) ou classe "2" (une ou plusieurs sortes d'effets cytotoxiques comme présence des granulations cytoplasmiques anormales, pycnoses, modifications nucléaires, perte de colorabilité, modification de l'index mitotique, cytolyse.) Le degré de l'action "in vivo" a été évalué pour chaque malade, selon trois classes: classe "0" (pas de diminution de volume des tumeurs), classe "1" (diminution incertaine de volume ou arrêt de la croissance), classe "2" (diminution de volume évidente). Lors de l'analyse des résultats, les auteurs concluaient à l'existence de la corrélation si l'effet clinique "0" coïncidait avec l'effet "in vitro" "0", ou bien si l'effet clinique "2" coïncidait avec l'effet en culture "2". Les cas où l'action clinique "1" coïncidait avec l'action "0" ou "2" en culture étaient considérés comme présentant une corrélation incertaine.

Dans ces conditions COBB, WRIGHT et coll., ont observé 50,4 p. 100 de corrélations certaines, 22 p. 100 de corrélations incertaines et 27,5 p. 100 de non corrélations. Fait important, dans le groupe composé uniquement de malades traités à l'aide de la perfusion locale, le pourcentage de corrélations certaines a atteint le chiffre de 82,3. Précisons que ces auteurs ont utilisé la méthode d'explantation de fragments tumoraux dans le coagulum plasmatique.

Dans une autre publication, COLOMB, WRIGHT et coll. (66) signalent 14 cas de corrélations entre l'effet "in vitro" et l'effet clinique sur 17 malades traités par perfusion locale.

AMBROSE, ANDREWS et coll. (2) admettant, à priori, la corrélation entre les effets "in vivo" et "in vitro" dans les cas de tumeurs traitées par la perfusion locale, proposent une autre technique de culture mettant en évidence les différences quantitatives entre l'action du Melfalan et du Chlorambucile. Ils utilisent les cultures obtenues non pas par explantation de fragments tumoraux, mais par explantation sur verre d'une suspension cellulaire préparée à partir du tissu tumoral par action de la trypsine. Pour comparer les effets des produits testés, ils procèdent à la numération des cellules survivantes dans les tubes de culture contenant les composés respectifs. La méthode AMBROSE, ANDREWS et coll. qui prétendent déterminer l'action du composé antitumoral "in vitro" avec une grande précision quantitative, nous a semblé, cependant, à l'essai, difficilement applicable dans la plupart des cas. En effet, la trypsinisation du prélèvement de biopsie peut entraîner, par action sélection sur

certaines cellules, une modification de la population cellulaire, de sorte que la culture ne porrepond plus entièrement à la composition cellulaire de la tumeur. Par ailleurs, cette méthode ne permet pas de distinguer facilement les cellules tumorales des cellules normales éventuellement présentes dans les cultures du fait de l'existence du stroma ou des zones de tissu normal dans la biopsie.

Au Laboratoire de Culture de Tissus et de Virologie à l'Institut Gustave Roussy, nous avons élaboré pour la sélection individuelle de composés anti-tumoraux une méthode qui nous paraît correspondre à la nécessité de distinguer les éléments tumoraux et d'offrir, en même temps, la possibilité d'évaluer avec suffisamment de précision les effets cytotoxiques sur les deux plans: quantitatif et qualitatif.

Notre procédé est le suivant:

Une portion de prélèvement opératoire ou biopsique, choisie dans la zone tumorale non nécrotique (de volume approximatif de 1 cc), est découpée à l'aide de deux lames de rasoir en petits fragments de 0,5 - 1 mm de côté. Ces fragments, suspendus dans la solution saline équilibrée (PBS + 5 p. 100 de sérum humain décomplémenté) sont ensuite passés à travers deux tamis en acier inoxydable - l'un à mailles larges, l'autre à mailles fines - dans le but d'éliminer les fragments trop volumineux et les débris. Les fragments sont ensuite explantés dans une goutte étalée d'un mélange de plasma de coq et d'extrait embryonnaire de poulet, sur une lamelle de verre, chaque lamelle portant 20 - 30 fragments dispersés. Après la formation d'un coagulum ferme, les lamelles porteuses de cultures sont placées dans les tubes aplatis de type BARSKI, contenant 1,5 cc de milieu nutritif (milieu 199 modifié selon BARSKI (12): 35 p. 100; solution de HANKS: 35 p. 100; sérum humain décomplémenté; 30 p. 100). Les composés anti-tumoraux respectifs sont préalablement dilués dans les échantillons de milieu destinés aux différents tubes de la série. On introduit ensuite dans les tubes le mélange de 95 p. 100 d'air et 5 p. 100 de CO₂, les tubes sont stérilement bouchés et placés dans un incubateur à 37°.

Les cultures sont ainsi maintenues pendant 7 à 8 jours. On renouvelle les milieux avec les composés testés toutes les 72 heures. Pour l'examen, les

cultures sont toutes fixées à l'alcool méthylique, colorées au May-Grunwald-Giemsa et montées au baume sur lames de verre.

A partir de chaque prélèvement opératoire ou biopsique, nous préparons ainsi 24 - 30 tubes de culture pour tester parallèlement 3 à 4 composés, isolément ou en association. Chaque composé est testé aux trois concentrations différentes (40 à 50 fragments, deux tubes de culture par concentration). La concentration de base est calculée d'après la dose clinique habituelle (la culture étant assimilée à 1,5 gr. de poids de l'organisme), son triple et son tiers. Les concentrations les plus faibles sont, du reste, du même ordre que celles utilisées dans l'étude citée de COBB, WRIGHT et coll.

Les composés anti-tumoraux que nous avons testés "in vitro", jusqu'à l'heure actuelle, sont: 5-Fluorouracile, Endoxan, Dégranol, Thio-Tépa, Méthotrexate, Actinomycine D.

Une fois les cultures fixées et colorées, l'estimation de l'effet des produits respectifs se fait, d'une part, d'après l'inhibition de la migration et de la croissance par rapport aux cultures témoins, d'autre part, d'après les lésions cellulaires éventuellement observées. L'évaluation chiffrée des résultats est basée sur le degré global de croissance dans les deux tubes correspondant à chaque concentration de la substance anti-tumorale. Le maximum possible de l'excroissance est représenté par le produit du nombre de fragments dans les deux tubes et le chiffre 3 (3 étant le maximum de l'excroissance d'un fragment tumoral). Nous transformons ensuite la valeur exprimant le degré de l'excroissance dans les deux tubes correspondants en pourcentage de l'excroissance maximale possible. L'effet inhibitif est finalement exprimé comme l'inverse du rapport entre le pourcentage atteint par l'excroissance en présence de la substance testée et le pourcentage atteint par l'excroissance des cultures témoins.

Cette estimation quantitative est accompagnée d'indications qualitatives concernant le caractère et le degré de souffrance cellulaire qui se manifeste par des lésions telles que la vacuolisation du cytoplasme et la diminution de la colorabilité (degré 1), irrégularités dans les contours des noyaux et altérations des nucléoles (degré 3), cytolyse (degré 3, disparition complète

des cellules (degré 4).

En examinant les résultats de nos tests qui portent, à l'heure actuelle, sur une vingtaine de prélèvements de biopsie explantés "in vitro", nous observons des différences notables, non seulement entre les réponses des cultures de tumeurs de types histo-pathologiques différents, mais encore entre les réponses des cultures de tumeurs d'un même type. Ainsi, pour citer un exemple, si nous comparons la sensibilité "in vitro" au 5-Fluorouracile de deux carcinomes bronchiques à petites cellules, nous observons, en suivant les trois concentrations croissantes, les indices de 4/100 - effet cytopathique degré 3, 0/100 degré 4, 0/100 degré 4 pour l'un, 13/100 - degré 2, 6/100 degré 2, 2/100 degré 2 pour l'autre. Autre exemple, pour deux dysembryomes testiculaires nous trouvons les indices de sensibilité au 5-Fluorouracile suivants: 3/100 - degré 1, 0/100 degré 4, 0/100 degré 4 pour l'une de ces deux tumeurs, 0/100 degré 4 aux trois concentrations pour la deuxième. La différence de sensibilité de ces mêmes dysembryomes testiculaires vis-à-vis du Dégranol a été également nette: 79/100 degré 1, 30/100 degré 1, 28/100 degré 1, pour le premier, 46/100 - pas d'effet cytopathique, 100/100 - pas d'effet cytopathique, 94/100 - pas d'effet cytopathique pour le deuxième.

Les tests de sensibilité aux composés anti-tumoraux "in vitro" nous semblent particulièrement utiles dans les cas de tumeurs très anaplasiques où le diagnostic histo-pathologique est incertain et les indications thérapeutiques par conséquent difficiles. Comparant les cultures de deux tumeurs de ce genre, carcinomes anaplasiques métastatiques, d'origine incertaine, nous avons trouvé que l'une était nettement sensible au 5-Fluorouracile (indices 0/100 - degré 4) et peu sensible à l'Actinomycine D (indices 12/100 - degré 3, 24/100 degré 3, 24/100 degré 3) tandis que l'autre réagissait, au contraire, moins au 5-Fluorouracile (indices 6/100 - degré 2, 12/100 - degré 3, 15/100 - degré 3) mais plus, aux concentrations fortes, à l'Actinomycine D (indices 30/100 - degré 2, 2/100 degré 3, 0/100 degré 4).

A la lumière de ces résultats qui mettent en évidence des différences dans les sensibilités aux composés anti-cancéreux de tumeurs individuelles et compte tenu de la probabilité de corrélation entre l'effet clinique et l'effet en culture "in vitro" rapportée par les auteurs cités plus haut, il nous semble que

de tels essais peuvent fournir des renseignements utiles lors du choix des substances anti-tumorales à utiliser chez un malade donné. Il est bien entendu que le diagnostic histo-pathologique, l'état du malade, l'emplacement et le degré évolutif de la tumeur ne perdent en rien de leur importance dans les décisions thérapeutiques. Les indications sur la sensibilité ou sur la résistance que le tissu tumoral a manifesté "in vitro" apportent, cependant, des éléments de bilan para-clinique supplémentaires, facilitant la tâche du chimiothérapeute.

CONCLUSIONS

Grâce aux perfectionnements techniques des méthodes de culture de tissus (cultures établies directement sur verre sans plasma, milieux nutritifs chimiquement définis, emploi d'enzymes protéolytiques pour dispersions de cellules, chambres à perfusion, etc.), il est devenu possible de maintenir, couramment et pendant de longues périodes, les cellules tumorales humaines en état d'activité vitale en dehors de l'organisme. Les cultures de ces cellules se prêtent facilement aux observations continues, au niveau des ensembles cellulaires aussi bien qu'au niveau des organites des cellules individuelles. Dans ces circonstances, il est devenu plus aisé de suivre l'effet sur les cultures des différents facteurs extrinsèques, étudiés dans des conditions déterminées et contrôlables. La culture de tissus fournit actuellement, plus que dans le passé, les moyens d'entreprendre des recherches irréalisables sur l'organisme humain "in vivo". Elle constitue ainsi un lien entre l'expérimentation sur animaux et l'expérimentation clinique, facilitant les extrapolations à la pathologie humaine des résultats obtenus sur les animaux de laboratoire.

En ce qui concerne la morphologie des cellules malignes "in vitro", d'une manière générale, il est encore difficile, en l'état actuel de nos connaissances, de formuler des critères absolus de leur distinction des cellules normales. Selon l'origine du tissu explanté, on retrouve une ou plusieurs grandes catégories des types cellulaires (fibroblastes, cellules épithélioïdes, macrophages, cellules nerveuses) aussi bien dans les cultures des tissus malins que dans celles des tissus normaux. Cependant, à l'examen plus approfondi des cultures des tissus cancéreux, on retrouve ce que nous appellerons, avec MURRAY, des signes du "syndrome de malignité cellulaire". Ces signes sont: tailles cellulaires et nucléaires très variables d'une cellule à l'autre, aspect vésiculaire des noyaux des fibroblastes d'origine cancéreuse, nucléoles de forme irrégulière, basophilie cytoplasmique accentuée, mitoses atypiques plus fréquentes que dans les cultures des tissus normaux, formation de tourbillons par les cellules sarcomateuses, tendance à une protéolyse importante du coagulum plasmatique supportant la culture.

D'un autre côté, certaines tumeurs prennent en culture "in vitro" des aspects caractéristiques de leurs origines histologiques. C'est en particulier le cas pour les tumeurs nerveuses, pour les ganglions de la maladie de Hodgkin, et pour certaines tumeurs des tissus somatiques mous. Ces cultures deviennent alors particulièrement précieuses comme contribution au diagnostic de la nature et la genèse histologique de la tumeur étudiée.

Des différences notables existent entre les aptitudes respectives d'adaptation à la vie "in vitro" des tumeurs et des tissus normaux individuels. Avec GEY, nous croyons qu'il n'y a pas de corrélation entre la malignité et le potentiel de prolifération de la culture. Le plus souvent, après une période initiale de prolifération, la croissance de la culture s'arrête et, au bout de quelques repiquages, la culture disparaît. Dans certains cas, cependant, des groupes de cellules, apparemment adaptées à la vie "in vitro" par le jeu de mutations et de sélections, prolifèrent activement. La culture se stabilise alors à la longue et, en principe, indéfiniment. Une souche cellulaire peut être rendue biologiquement homogène par les techniques de clonage. Les souches cellulaires, et tout particulièrement les souches clonales, représentent un matériel d'étude précieux permettant l'expérimentation sur des quantités importantes de cellules ayant des caractères uniformes bien définis.

Les modifications de physiologie et de morphologie cellulaires au sein des populations cellulaires "in vitro" sont déterminées essentiellement par des cycles de mutations et de sélection. Cette évolution va, habituellement, dans le sens de la différenciation fonctionnelle et morphologique. Dans certaines conditions, cependant, une ré-différenciation peut se produire. Ainsi, par exemple, la culture prolongée à la température sub-optimale, a permis de déceler les structures caractéristiques de l'origine de certaines tumeurs anaplasiques.

L'étude de la transformation et de la cancérisation "in vitro" des cellules normales d'origine humaine présente des difficultés méthodologiques considérables. A part l'homogreffe sur volontaires humains, exceptionnelle, mais par laquelle toutefois SCUTHAIR a essayé de prouver l'acquisition de malignité "in vitro" par les cellules humaines normales, nous ne disposons, à l'heure actuelle, que de critères indirects; tels que le "syndrome morphologique de malignité cellulaire". Des signes de conversion maligne "in vitro" ont été observés dans

des cultures exposées aux substances cancérigènes, à l'action de certains virus ou aux entraves métaboliques. Dans les où la cancérisation en culture a été apparemment spontanée, elle pourrait être le reflet des effets des constituants de milieux non contrôlables (en particulier des sérums hétérologues), de l'anaérobiose relative, ou de la contamination par des virus oncogènes inconnus.

En associant, en cultures mixtes, les tumeurs et les tissus humains normaux, il est possible de visualiser leurs interactions directes, en dehors bien entendu, des influences, pourtant capitales, de l'organisme dans son ensemble. L'invasion des zones de cellules normales par les cellules malignes, les différences notables dans le comportement migratoire de ces deux populations, la prolifération active des cellules malignes au contact de cellules normales sont reproductibles "in vitro" et ont été observées par divers auteurs.

Dans les recherches immunologiques, les cultures de tumeurs humaines ont été utilisées soit en tant que source de matériel antigénique, soit comme système cible permettant de démontrer l'existence des réactions immunologiques. Toutefois, les résultats acquis ne permettent pas, à l'heure actuelle, de fixer avec certitude les parts respectives, dans les phénomènes observés, des effets des antigènes d'espèce ou d'individu et des antigènes proprement tumoraux.

L'introduction des techniques quantitatives dans les études radiobiologiques sur des cultures "in vitro" a permis d'observer les conséquences de l'irradiation sur les cellules tumorales et normales humaines. La radiosensibilité a été ainsi évaluée avec précision, ainsi que ses modifications sous l'influence des substances radiosensibilisatrices ou radioprotectrices.

Dans le domaine de la biochimie, les tumeurs humaines "in vitro" ont, parmi d'autres applications, été utilisées dans les expériences tendant à vérifier l'hypothèse de Warburg. Sur ce sujet, les travaux publiés mettent en évidence surtout des différences d'ordre quantitatif, la glycolyse aérobie étant, de règle, plus importante dans les cultures tumorales que dans les cultures de tissus normaux. D'autres recherches biochimiques ont porté sur l'équipement enzymatique des cellules tumorales ainsi que sur leur hormono-dépendance "in vitro".

Les cultures des tumeurs humaines sont utilisées également pour la sélection de nouvelles substances chimiothérapeutiques: ici, la comparaison avec les cultures des cellules humaines normales est parfois révélatrice.

Certains aspects de la culture des tumeurs humaines "in vitro" permettent d'envisager leur utilité directe dans la solution de nombreux problèmes posés par le diagnostic et le traitement du cancer clinique. Comme nous l'avons déjà mentionné, la culture de tissus peut apporter, pour certaines tumeurs au moins, un moyen supplémentaire pour l'établissement du diagnostic histopathologique, sans prétendre, toutefois, remplacer l'examen des coupes histologiques. Dans les conditions de culture habituelles, les images caractéristiques "in vitro" sont fournies, en particulier, par les tumeurs nerveuses (neurinomes, neuroblastomes, syntathoblastomes, épandynomes). Il en est de même pour les ganglions de la maladie de Hodgkin, et pour certaines tumeurs des tissus somatiques mous. Dans l'avenir, des techniques de culture organotypiques, pourraient étendre utilement cette méthode sur d'autres tumeurs; par ailleurs, d'autres critères encore pourraient être introduits dans l'identification "in vitro" des tumeurs humaines et dans leur classification. Nous pensons, notamment, à l'analyse du comportement cellulaire dynamique (migration, mouvements des organites) sur les films microcinématographiques pris au ralenti, à l'étude de la charge électrique cellulaire par le truchement de l'électrophorèse de cellules, à la recherche des exigences métaboliques, etc.

Les tests de sensibilité des tumeurs aux composés chimiothérapeutiques, effectués sur des cultures "in vitro" de courte durée des biopsies de malades individuels, constituent une autre application possible de cette technique. La corrélation entre l'effet direct du composé sur les cellules tumorales cultivées "in vitro" et l'effet clinique semble significative selon les travaux de COBB. Cette concordance est surtout frappante lorsque le malade est traité par perfusion locale. Un test simple, utilisant pour chaque tumeur une série de cultures préparées par explantation de fragments du tissu tumoral dans le coagulum plasmatique et cultivées en tubes en présence du milieu nutritif contenant les substances testées, permet, par évaluation de l'excroissance dans les cultures respectives, d'indiquer le spectre de sensibilité "in vitro" pour les tumeurs individuelles et d'enrichir ainsi les renseignements para-cliniques utiles lors de la décision thérapeutique.

Ainsi il se révèle que, dans l'ensemble, le procédé de culture "in vitro" des tissus tumoraux humains, perfectionné par les progrès récents de cette technique, ouvre de nouvelles voies aussi bien sur le plan expérimental que dans le domaine des applications para-cliniques immédiates.

Vu, le Président de Thèse
Professeur Jean BERNARD

Vu, le Doyen de la Faculté
Professeur L. BINET

Vu et Permis d'imprimer
Le Recteur de l'Académie de Paris
J. ROCHE

B I B L I O G R A P H I E

- (1) ABERCROMBIE and HEAYSMAN: Invasiveness of sarcoma cells.
Nature, 174: 697: 1954
- (2) AMBROSE, ANDREWS, EASTY, FIELD and WYLIE: Drug assays on the culture of human tumour biopsies.
The Lancet, p. 24, January 6: 1962
- (3) AMBROSE, JAMES and LOWICK: Differences between the electrical charge carried by normal and homologous tumour cells. Nature, 177: 576: 1956
- (4) ANDERSON: Science, 117: 627: 1953
- (5) ARNOLD: Arch. Mikrosk. Anat., 30: 205: 1887
- (6) BARBAN and SCHULTZE: Metabolism of tissue culture cells. The presence in HeLa cells of the enzymes of the citric acid-cycle.
J. Biol. Chem., 222: 665: 1956
- (7) BARON and RABSON: A culture strain ("LAC") of human epithelium-like cells from an adenocarcinoma of the lung.
Proc. Soc. Exp. Biol; & Med., 96: 515: 1957
- (8) BARSKI: Utilisation pour la culture de tissus "in vitro" de récipients en résine éthoxylique polymérisés (Araldite B).
Bull. Microscopie Appl., 4: 112: 1954
- (9) BARSKI: Tubes à lamelles applicables à différentes techniques de cultures de tissus. Ann. Inst. Pasteur, 90: 512: 1956
- (10) BARSKI: Cancérisation "in vitro". Revue Générale.
Rev. Franç. Et. Clin. & Biol., 7: 543: 1962
- (11) BARSKI et BELEHRADEK: Invasion cancéreuse "in vitro". Film blanc/noir, Institut Gustave Roussy, 1961
- (12) BARSKI, BIEDLER and CORNEFERT: Modification of characteristics of an "in vitro" mouse cell line after an increase of its tumor-producing capacity. J. Nat. Cancer Inst., 26: 865: 1961
- (13) BARSKI and CORNEFERT: Response of different mouse cell strains to polyoma infection "in vitro". Latency and self-inhibition effect.
J. Nat. Cancer Inst., 28: 823: 1962
- (14) BARSKI, CORNEFERT et BIEDLER: Caractères évolutifs et permanents de cellules d'homme et de lapin au cours de leur adaptation à la vie "in vitro". Ann. Inst. Pasteur, 100: 324: 1961

- (15) BARSKI, MAURIN, WIELGOSZ et LEPINE: Conditions de nutrition cellulaire "in vitro" en culture sans support plasmatique. Rôle des fractions micro et macromoléculaires. Ann. Inst. Pasteur, 81: 9: 1951
- (16) BARSKI et ROBINEAUX: Chambre à perfusion démontable et stérilisable pour cultures de tissus de longue durée. Ann. Inst. Pasteur, 90: 514: 1956
- (17) BARSKI and ROBINEAUX: Evolution of herpes simplex cellular lesions observed "in vitro" by phase contrast microcinematography. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 101: 632: 1959
- (18) BARSKI, ROBINEAUX and ENDO: Evolution of the cellular lesion induced by poliomyelitis virus "in vitro" as studied with phase contrast microcinematography. Ann. New York Acad. Sc., 61: 899: 1955
- (19) BARSKI et WEI: Différentiation du tissu nerveux en culture sur membranes plastiques. Ann. Inst. Pasteur, 77: 674: 1949
- (20) BASES: Some applications of tissue culture methods to radiation research. Cancer Research, 19: 311: 1959
- (21) BASES: Modifications of the radiation response determined by single-cell techniques: Actinomycin D. Cancer Research, 19: 1223: 1959
- (22) BERMAN, STULBERG and RUDDLE: Human cell culture. Morphology of the Detroit strains. Cancer Research, 17: 668: 1957
- (23) BIESLIE: Selective toxicology. Antimetabolite action on cancer cells in culture. in: Proc. of the 3rd National Cancer Conf., American Cancer Society, 1957
- (24) BINES, PLANEL et DAVID: Action des oestrogènes sur la souche cellulaire cancéreuse HeLa. C.R. Soc. Biol., 153: 1072, 1959
- (25) BJORKLUND and BJORKLUND: Antigeneity of pooled human malignant and normal tissues by cyto-immunological technique: presence of an insoluble, heat-labile tumor antigen. Int. Arch. All., 10: 153: 1957
- (26) BROCKMAN, KELLEY and all.: Biochemical aspects of resistance to 6-mercaptopurine in human epidermoide carcinoma cells in culture. Nature, 191: 469: 1961
- (27) BRUYANT, EVANS, SCHILLING and MARLE: Effect of chemically defined medium NCTC 109 supplemented with Methocel and of silicone coating the flasks on strain 2071 cells in suspension culture. J. Nat. Cancer Inst., 26: 239: 1961
- (28) BUFFE: Action de l'actinomycine en culture de tissus. Thèse Faculté de Médecine, Paris, No. 84, 1958

- (29) BURROWS: The cultivation of tissues of the chick embryo outside the body. J.A.M.A., 55: 2057: 1910
- (30) BURROWS: The growth of human malignant tumors in vitro. Med. Record, 86: 649: 1914
- (31) CAMERON and CHAMBERS: Am. J. Cancer, 30: 114: 1937
- (32) CARREL: Artificial activation of the growth in vitro of connective tissue. J. Exp. Med., 17: 14: 1913
- (33) CARREL: A method for the physiological study of tissues "in vitro". J. Exp. Med., 38: 407: 1923
- (34) CARREL and BURROWS: Cultivation of sarcoma outside the body. J.A.M.A., 55: 1554: 1910
- (35) CARREL and BURROWS: Cultivation of adult tissues and organs outside the body. J.A.M.A., 55: 1379: 1910
- (36) CARREL and BURROWS: Human sarcoma cultivated outside of the body. J.A.M.A., 55: 1732: 1910
- (37) CARREL and BURROWS: Cultivation of tissues "in vitro" and its techniques. J. Exp. Med., 13: 387: 1911
- (38) CARREL and EBELING: J. Exp. Med., 48: 105: 1928
- (39) CHAMPY: Sur les phénomènes cytologiques qui s'observent dans les tissus cultivés en dehors de l'organisme. C.R.Soc.Biol., 72: 124: 1912
- (40) CHLOPINE: On the cultivation of neurogenic tumors of man outside the organism. Dokl. Akad. Nauk. SSSR., 41: 152: 1943
- (41) COBB: Tissue culture observations of the effect of chemiotherapeutic agents of human tumors. Trans. New York Acad.Sc., 17: 237: 1954
- (42) COBB, WALKER and WRIGHT: Comparative chemotherapeutic studies on primary short term cultures of human normal, benign and malignant tumor tissues - a five-year study. Cancer Research, 21: 583: 1961
- (43) COMAN: Human neoplasms in tissue culture. Cancer Research, 2: 618: 1942
- (44) COSTERO, POMERAT and all.: Tumors of the human nervous system in tissue culture. I. The cultivation and cytology of meningioma cells. J. Nat. Cancer Inst., 15: 1319: 1955
- (45) CRACIUM: La culture des tissus en biologie expérimentale. Masson & Edit., Paris, 1931
- (46) DULBECCO: Proc. Nat. Acad. Sc., 38: 747: 1952

- (47) DULBECCO and VOGT: J. Exp. Med., 99: 167: 1954
- (48) EAGLE: Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. Science, 122: 501: 1955
- (49) EAGLE: The sustained growth of human and animal cells in a protein-free environment. Proc. Nat. Acad. Sc., 46: 427: 1960
- (50) EAGLE: Propagation in fluid medium of a human epidermoid carcinoma, strain KB. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 89: 362: 1955
- (51) EAGLE and FOLEY: The cytotoxic action of carcinolytic agents in tissue culture. Am. J. Med., 21: 739: 1956
- (52) EAGLE and FOLEY: Cytotoxicity in human cell cultures as a primary screen for the detection of antitumor agents. Cancer Research, 18: 1027: 1958
- (53) EEBLING: Fibrin and serum as a culture medium. J. Exp. Med., 33: 641: 1921
- (54) ENDERS: Bovine amniotic fluid as tissue culture medium in the cultivation of poliomyelitis and other viruses. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 82: 100: 1953
- (55) EVANS, BRUYANT, FIORAMONTI, McQUILKIN, SANFORD and EARLE: Studies of nutrient media for tissue cells "in vitro". Cancer Research, 16: 77: 1956
- (56) EVANS and EARLE: The use of perforated cellophane for the growth of cells in tissue culture. N. Nat. Cancer Inst., 8: 103: 1947
- (57) FISCHER: Biology of tissue cells. Cambridge Univ. Press, London, 1946
- (58) FISCHER: The application of soybean inhibitor in tissue cultivation. Science, 109: 611: 1949
- (59) FISCHER and LAZER: A. Krebsforsch, 26: 80, 1927-28
- (60) FOLEY and HANDLER: Transplantation of cultured cells into the hamster cheek pouch. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 94: 661: 1957
- (61) GEY: Some aspects of the constitution and behavior of normal and malignant cells maintained in continuous culture. Harvey Lect., 50: 154: 1954-55
- (62) GEY, BANG and GEY: An evaluation of some comparative studies on cultured strains of normal and malignant cells of animals and man. Texas Rep. Biol. Med., 12: 805: 1954
- (63) GEY, COFFMAN and KUBICK: Tissue culture studies of the proliferation capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. Cancer Research, 12: 264: 1952

- (64) GLATTHAAR: L'emploi de la culture de tissus et de la microscopie à différence de phase pour le jugement pronostique des lésions précancéreuses du col utérin. Bruxelles Médical, 29: 1911: 1949
- (65) GOLDSTEIN: A method for more critical isolation of clones derived from three human cell strains "in vitro". Cancer Res., 17: 357: 1957
- (66) GOLOMB, POSTELL, HALL, GUMPORT, COX and WRIGHT: Chemotherapy of human cancer by regional perfusions. Cancer, 15: 828: 1962
- (67) GRAND: Cytoplasmic inclusions and the characteristics of Hodgkin's diseased lymph nodes in tissue culture. Cancer Res. 9: 182: 1949
- (68) GRAND and AYRE: Studies of developing cervical neoplasma (cell behavior "in vitro"). Obst. Gynec., 4: 411: 1954
- (69) HANKS and WALLACE: Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 71: 196: 1949
- (70) HARRISON: Observations on the living developing nerve fiber. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 4: 140: 1907
- (71) HINZ and SYLERTON: Mammalian cell cultures for study of influenza virus. 1. Preparation of monolayer cultures with collagenase. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 101: 19: 1959
- (72) HIRSCHBERG: Laboratory aspects of cancer chemotherapy. Proc. N.Y. State Ass. Publ. Health Lab., 35: 62: 1955
- (73) HIRSCHBERG: Tissue culture in cancer chemotherapy screening. Cancer Res., 18: 869: 1958
- (74) HIRSCHBERG, MURRAY, PETERSON, KRLAN, SCHFRANK and POOL: Enzymatic deamination of 8-azaguanine of normal human brain and in glioblastoma multiforme. Cancer Res., 13: 153: 1953
- (75) HOSKINS and MONTGOMERY: Nuclear phagocytosis by HeLa and Chang liver cells in tissue culture as studied by time-lapse contrast cinematography. Exp. Cell Res., 26: 534: 1962
- (76) HOSIER and REIMAN: Studies in Hodgkin's syndrome X. Cancer Res., 10: 423: 1950
- (77) HSU: Observations on mitosis and chromosomes. Tex. Rep. Biol. Med., 12: 833: 1954
- (78) JOLLY: Sur la durée de la vie et de la multiplication des cellules animales en dehors de l'organisme. C. Ren. Soc. Biol., 55: 1266: 1903

- (79) JORDAN: Human nasal cells in continuous culture.
Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 92: 867: 1956
- (80) KOPROWSKY: Transformation of cultures of human tissue infected with simian virus SV 40. J. Cell. Comp. Physiol., 59: 281: 1962
- (81) KUTSKY, TRAUMAN and All.: Nucleoprotein fractions from various embryonic tissues. A comparison of physicochemical characteristics and biological activity in tissue culture. Exp. Cell Res., 10: 48: 1956
- 82) LANE, MURRAY and FRASER: Neurilemoma of the lung confirmed by tissue culture. Report of a case. Cancer, 6: 780: 1953
- (83) LASFARGUES: Cultivation and behavior "in vitro" of the normal mammary epithelium of the adult mouse. Exp. Cell Res., 13: 553: 1957
- (84) LASFARGUES and OZZELLO: Cultivation of human breast carcinoma. J. Nat. Cancer Inst., 21: 1131: 1958
- (85) LASNITZKI: The effect of 3-4 benzpyrene on human fetal lung grown "in vitro". J. Path. and Bact., 71: 262: 1956
- (86) LEIGHTON: A sponge matrix method for tissue culture. Formation of organized aggregates of cells "in vitro". J. Nat. Cancer Inst., 12: 545: 1951
- (87) LEIGHTON: The growth patterns of some transplantable animal tumors in sponge matrix tissue culture. J. Nat. Cancer Inst., 15: 275: 1954
- (88) LEIGHTON: Studies on human cancer using sponge matrix tissue culture. Tex. Rep. Biol. Med., 12: 847: 1954
- (89) LEIGHTON: Contribution of tissue culture studies to an understanding of the biology of cancer. A review. Cancer Res., 17: 929: 1957
- (90) LEIGHTON and KLINE: Studies on human cancer using sponge matrix tissue culture. J. Nat. Cancer Inst., 16: 1353: 1956

- (91) LEIGHTON, KLINE and ORR: Transformation of normal human fibroblasts into histologically malignant tissue "in vitro". Science 123:503:1956
- (92) LESLIE, FULTON and SINCLAIR: The metabolism of human embryonic and malignant cells and their response to insulin. Bioch. et Biophys. Acta, 24: 365: 1957
- (93) LEWIS: Arch. Exper. Zellforsch., 23: 8: 1939
- (94) LEWIS and LEWIS: The cultivation of tissues from chick embryos in solutions of NaCl, CaCl₂, KCl and NaHCO₃. Anat.Rec., 5: 277: 1911
- (95) LJUNGGRUN: Deut. Ztschr. Chir., 47: 608: 1897
- (96) LOEB: On the growth of epithelium in agar and blood serum in the living body. J. Med. Res., 8: 109: 1902
- (97) LOSEE and EBELING: The cultivation of human sarcomatous tissue "in vitro". J. Exp. Med., 20: 140: 1914
- (98) MACCABRUNI: Esperienze di coltivazione "in vitro" del cancro uterino umano. Ann. di Ostet., 36: 57: 1914
- (99) MALHERBE: Cultivation of human tissues in media containing bovine allantoic and amniotic fluids. Proc.Soc.Exp. Biol.& Med., 86:124: 1954
- (100) MAXIMOV: Ztschr. mikr.-anat. Forsch., 17: 625: 1929
- (101) McQUILKIN and LARLE: Cinematographic analysis of cell populations "in vitro". J. Nat. Cancer Inst., 28:763: 1962
- (102) MILGROM: A short review of immunological investigations on cancer. Cancer Res., 21:862: 1961
- (103) MILLER and HSU: The action of cytotoxic antisera on the HeLa strain of human carcinoma. Cancer Res., 16: 306: 1956

- (104) MOORE: Growth characteristics of normal and malignant cervical epithelium in tissue culture. Am.J.Obst.Gyne., 64: 13: 1952
- (105) MOORE, SABACILWSKY and TOOLAN: Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells. Cancer Res., 15: 598: 1955
- (106) MOORE: Biological considerations on normal and abnormal cell lines. Transact. N.Y. Ac. Sci., Sec. II., 19: 435: 1957
- (107) MORGAN, MORTON and PARKER: Nutrition of animal cells in tissue culture. I. Initial studies on a synthetic medium. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 73: 1: 1950
- (108) MORGAN and PARKER: The use of antitryptic agents in tissue culture. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 71: 665: 1949
- (109) MOUNTAIN: Cytopathogenic effect of antiserum to human malignant epithelium cells (strain HeLa) on HeLa cell culture. J. Immun. 75: 478: 1955
- (110) MURRAY: Uses of tissue culture in the study of malignancy. In: H. Burger: The physiopathology of cancer. Hoeber, Ed., New York, 1959
- (111) MURRAY and STOUT: Characteristics of a liposarcoma grown "in vitro". Am. J. Path., 19: 751: 1943
- (112) MURRAY and STOUT: Distinctive characteristics of the sympathicoblastoma cultivated "in vitro". A method for prompt diagnosis. Am. J. Path., 23: 429: 1947
- (113) MURRAY and STOUT: Cultural characteristics of some human tumors derived from new cells at various stages of differentiation. Acta Unio Intern. Contra Cancr., 6: 1007: 1950
- (114) The classification and diagnosis of human tumors by tissue culture methods. Tex. Rep. Biol. Med., 12: 898: 1954
- (115) MURRAY and STOUT: Tissue culture in tumor classification and diagnosis. In: Pack and Ariel: Treatment of cancer and allied diseases. Hoeber, Ed., New York, 1958

- (116) NORBY, ERIKSSON and MEILGREN: Growth, morphology and karyotype in two pairs of human cell strains of malignant and benign origin from the same individual. *Cancer Res.*, 22, 247: 1962
- (117) ORR and McSWAIN: Tissue culture of human breast carcinoma. *Am. J. Path.*, 31: 125: 1955
- (118) PARKER: The races that constitute the group of common fibroblasts. II. The effect of blood plasma. *J. Exp. Med.*, 55: 717: 1932
- (119) PARKER: Methods of tissue culture. Hoeber, Ed., New York: 1962
- (120) PAUL: Cell and tissue culture. Livingstone, London: 1959
- (121) PAUL: A perfusion chamber for cinematographic studies. *Quart. J. Micr. Sci.*, 2: 165: 1957
- (122) PEARSE: Histochemistry, theoretical and applied. Little, Brown & Co., ed., Boston: 1960
- (123) POMERAT: Perfusion chambers. In: *Methods in Medical Research* vol.44: Year Book Publishers, Ed. Chicago: 1951
- (124) POMERAT: Cinematography, indispensable tool for cytology. *Intern. Rev. Cytol.*, 11: 307: 1961
- (125) PORTER and HAWN: The culture of tissue cells in clots, formed from purified bovine fibrinogen and thrombin. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 65: 309: 1947
- (126) PUCK: "In vitro" studies on the radiation biology of mammalian cells. In: *Progress in Biophysics*, Vol. 10. Pergamon Press, ed. Oxford: 1960
Feder. Proc. 20: 31; suppl. 8, 1961
- (127) PUCK: Cellular aspects of irradiation and aging in mammals.
- (128) PUCK and MARCUS: Action of X-rays on mammalian cells. I. *J. Exp. Med.*, 103: 653: 1956
- (129) PUCK, MORKOVIN, MARCUS and CILCIURA: Action of X-rays on mammalian cells. II. *J. Exp. Med.*, 106: 485: 1957

- (130) PUCK, MARCUS and CIECIURA: Clonal growth of mammalian cells "in vitro".
J. Exp. Med., 103: 272: 1956
- (131) PURDOM, AMBROSE and KLEIN: A correlation between electrical surface change and some biological characteristics during the stepwise progression of a mouse sarcoma. Nature, 181: 1586: 1958
- (132) ROBINEAUX: Technique dynamique de pharmacologie cellulaire applicable à l'étude des substances cytotoxiques en culture de tissus.
In: C. Rend. du Coll. Intern. Chimiothér. des Cancers, Paris 1957.
CNRS, Ed., 1958
- (133) ROBINEAUX et BARSKI: Platine thermostatique à perfusion d'eau pour l'observation prolongée de cellules vivantes.
Ann. Inst. Pasteur, 91: 106: 1956
- (134) ROSE: Special uses of the multipurpose tissue culture chamber.
Texas Rep. Biol. Med., 15: 310: 1957
- (135) ROSE: An appraisal of a biological response by strain HeLa cells in tissue culture to 100 human sera. Cancer Res., 18: 411: 1958
- (136) ROSE: The Golgi complex and endoplasmic reticulum in tissue-cultured human melanoma cells with phase contrast microscopy.
Cancer Res., 21: 706: 1961
- (137) ROSE, POMERAT and all.: A cellophane-strip technique for culturing tissue in multipurpose culture chambers.
J. Biochem. Biophys. Cytol., 4: 761: 1958
- (138) ROTTINO: "In vitro" studies of lymph nodes involved in Hodgkin's disease. Arch. Path., 47: 317: 1949
- (139) ROUS and JONES: A method of obtaining suspensions of living cells from the fixed tissues, and for the plating out of individual cells.
J. Exp. Med., 23: 549: 1915
- (140) ROUX: Beiträge zur Entwicklungsmechanik des Embryo.
Ztschr. Biol., 21: 411: 1885
- (141) SANFORD, EARLE and LIKELY: The growth "in vitro" of single isolated tissue cells. J. Nat. Cancer Inst., 9: 229: 1948

- (142) SANO, WLISS and GAUET: Pleural mesothelioma.
J. Thoracic Surg., 19: 783: 1950
- (143) SCOTTI, WRYK, DORSER, SIGLL: Transplantation of human malignant epithelial cells from tissue culture to rat brains. Cancer Res., 20:58:1960
- (144) SOUTHAM and MOORE: Induced immunity to cancer homografts in man.
Ann. N.Y. Ac. Sci., 73: 635: 1958
- (145) SOUTHAM, MOORE and RHOADS: Homotransplantation of human cell lines.
Science, 125: 158: 1957
- (146) STOUT: Tumors of the soft tissues. Arm. Forc. Inst. Path. sect. II, Fasc. 5, 1963
- (147) SWIM and PARKER: Cité par PARKER et coll. p. 309. In: Cellular Biology, Nucleic acids and viruses. N.Y. Ac. Sci., Ed., 1954
- (148) SYKLS, DMOCHOWSKI, SCHULLENBERGER and HOWE: Tissue culture studies on human leukemia and malignant lymphoma. Cancer Res., 22: 21: 1962
- (149) TIMOFLEYEVSKY: Tumor origin as determined by tissue culture.
Am. Rev. Soc. Med., 4: 106: 1946-47
- (150) WEITZMANN: Arch Exper. Zellforsch., 22: 347: 1938-39
- (151) WELLINGS, BANISHAK and SELGEL: Cytological studies of human melanoma cultured "in vitro". Cancer Res., 20: 347: 1960
- (152) WILLMER: Cytology and evolution. Academic Press, Ed. New York & London, 1960
- (153) WOLFF et WOLFF: Cultures de cellules cancéreuses humaines sur des organes embryonnaires de poulet, explantés "in vitro" in: La culture organotypique. Colloque Intern. CNRS, Paris 1961
- (154) WOLFF, WOLFF, ZAGURY et LEGER: Recherches sur les conditions de la culture organotypique de cancers humains. Presse Med., 70:2387:1962

(155) WRIGHT, COBB, GUMPORT, WALKER and all. Further investigations of the relation between the clinical and tissue culture response to chemotherapeutic agents on human cancer. Cancer, 15: 284: 1962

(156) YOUNGNER: Monolayer tissue cultures.
Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 85: 202: 1954



**AGEMP
POLYCOPIE**

8, rue Dante
PARIS - V •

Téléphone : ODÉon 58-96